

養鰻における疾病の早期検知技術の開発

中城 岳

1 目的

県内ではウナギ養殖が盛んに行われているが、疾病によるへい死被害が大きな問題となっており、年間被害金額は約9千万円にもものぼる。

本研究では、本県のウナギ養殖において最もへい死被害の大きい「パラコロ病」の早期検知技術の開発を目的として、①qPCRを用いた環境水からの *E. anguillarum* 細菌量の定量検出手法の確立、②当該手法を用いた感染試験による *E. anguillarum* の細菌量動態のモニタリング、③養鰻池における *E. anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリングを行う。なお、本事業は令和3年度から5年度までの3カ年事業であり、令和4年度については、②及び③を実施した。

2 材料と方法

(1) 水槽での感染試験による *E. anguillarum* の細菌量動態のモニタリング

パラコロ病に感染したウナギから飼育水中に排出される原因菌の細菌量をモニタリングするため、令和3年度に実施した浸漬法に加え、腹腔内注射法を用いて感染試験を実施した。

供試魚及び供試菌株

供試魚は過去5年間でパラコロ病の発生歴のない養殖場を営んでいる県内養鰻業者から入手した、魚体重約50~100g/尾のニホンウナギを用いた。供試菌株は当所保有のKFCB-617株とし、病原性を高めるため以下の手法で魚体通過させた後、攻撃用菌株として使用した。

- ・ハートインフュージョン液体培地（以下、HI液体培地）5.0mLに接種後、30℃、24時間静置培養
- ・培養液を供試魚1尾の腹腔内に接種し、死亡魚の腎臓からSS寒天培地で分離した菌株を、HI液体培地で30℃、24時間静置培養後、80%グリセロールと混和し、-80℃で冷凍保存

飼育水槽の環境条件

30Lアクリル水槽に1尾を収容した。飼育水の水温はヒーターで30℃に維持した。また、十分なエアレーションを行い、一定の溶存酸素量が保持されるようにした。なお、飼育水の換水は1回転/5時間の微換水とし、飼育期間中は無給餌とした。

供試魚及び飼育水の分析

供試魚については、死亡個体は取り上げ後、症状の確認、肝臓及び腎臓組織の塗抹標本の観察、サルモネラ・シゲラ寒天培地（以下、SS寒天培地）による菌分離を行い、肝臓及び腎臓組織からDNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen) を用いて抽出したDNAサンプルをqPCRに供し、陽性が確認されたサンプルについては、Qubit fluorometer (invitrogen) を

用いて、各抽出 DNA1.0ng あたりの原因菌 DNA コピー数を算出した。なお、生存魚は試験終了日に全て取り上げ、同様の検査を実施した。また、飼育水については、試験開始 0 日目から試験終了日まで、オーバーフロー排水を毎日 50mL 採水し、中城 (2021) の手法に従い、飼育水中の細菌量 (CFU/L) を推定した。また、ガラス電極式水素イオン濃度指示計 HM-30P (東亜 DKK) を用いて飼育水の pH を測定した。

感染試験

①浸漬感染法

第 1 回から第 4 回の計 4 回、浸漬感染法による感染試験を実施した。攻撃用菌株を HI 液体培地 200mL に接種後、30°C で 24 時間静置培養し、この培養液を地下水 1.8L と混合し、浸漬攻撃液 2L とした。浸漬時間は 15 分から 1 時間とし、対照区については、地下水 2L へ 30 分から 1 時間浸漬した。また、攻撃用菌株の培養液を超純水で 10^0 - 10^{-9} の 9 段階に希釈後、各希釈系列 10 μ L を SS 寒天培地に塗布し、30°C で 24 時間培養後、培地上のコロニー数を計数し、1 尾あたりに投与した生菌数 (CFU/尾) を算出した。なお、供試魚は攻撃区及び対照区の計 2 区で各 2 尾ずつ、計 4 尾とした。

②腹腔内注射法

第 5 回から第 6 回の計 2 回、注射法による感染試験を実施した。攻撃用菌株を HI 液体培地 5.0mL に接種後、30°C で 24 時間静置培養し、培養液を 1 尾あたり 0.1mL ウナギの腹腔内へ注射した。対照区については、同量の滅菌 PBS を腹腔内へ注射した。また、①と同様の手法で攻撃用菌株の培養液の生菌数 (CFU/尾) を算出した。なお、供試魚は攻撃区及び対照区の計 2 区で各 2 尾ずつ、計 4 尾とした。

(2) 養鰻池における *E.anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリング

県内養鰻業者のうち、パラコロ病の発生歴と飼育水の加温状況を基準として、4 者をモニタリング対象とした (表 1)。各業者の 2 池をモニタリング対象池として、毎月 1 回、投げ込み式多項目水質測定器 HI-9828 (HANNA instruments) を用い、水温、pH、溶存酸素量 (DO)、塩分及びアンモニア態窒素量を、ポータブル亜硝酸態窒素測定器 HI 97707 (HANNA instruments) を用い、亜硝酸態窒素量を測定した。また、飼育水 1L を採水し、当所へ持ち帰った後、中城 (2021) の手法に従い、飼育水中の *E.anguillarum* 細菌量 (CFU/L) を推定した。得られた水質及び細菌量の相関については、統計解析ソフト「EZR (ver. 1.61)」(Kaneda, 2013) を用いて検定を行った。

さらに、モニタリング対象以外の飼育池でパラコロ病が発生した場合は、不定期のモニタリングとして、判明日から約 30 日間、2 日に 1 回の頻度で飼育水 1L を採水し、同様の手法で飼育水中の細菌量 (CFU/L) を推定した。

3 結果及び考察

(1) 水槽での感染試験による *E.anguillarum* の細菌量動態のモニタリング

①浸漬感染法

攻撃用菌株培養液の細菌量は $2.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mL であり、浸漬攻撃液の細菌量は $2.0 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^7$ CFU/mL であった。

4 回の感染試験の結果、いずれの供試魚も死亡しなかった（表 2）。試験区の供試魚に症状が見られず、SS 寒天培地上に細菌コロニーが出現せず、さらに、肝臓及び腎臓の抽出 DNA サンプルから原因菌の DNA が検出されなかったことから、いずれの試験についても感染が成立していなかったと考えられた。そのため、飼育水の分析は実施しなかった。

②腹腔内注射法

攻撃用菌株培養液の細菌量は 3.6×10^5 CFU/mL \sim 4.4×10^6 CFU/mL であり、1 尾あたりの投与細菌量は $3.6 \times 10^4 \sim 4.4 \times 10^5$ CFU/尾であった。

2 回の感染試験の結果、試験区の供試魚は 7～14 日で死亡した（表 3）。これらの供試魚には肛門や臀鰭の発赤症状が見られ、塗抹標本の観察で肝臓及び腎臓に短桿菌の増殖が見られ、肝臓及び腎臓の抽出 DNA サンプルが qPCR 陽性であったことから、供試魚はパラコロ病を発症し死亡したと考えられた。当該手法による死亡までの日数は自然感染による死亡までの日数（約 10 日間）に近似していることから、自然感染に近いパラコロ病の発症を再現することができたと考えられた。

また、試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移は図 1 及び 2 の通りであった。特に第 5 回試験においては、試験区のいずれの水槽でも、感染後 2, 3 日で飼育水中の細菌量が急増し、その後横ばい傾向を経て死亡することが確認され、細菌量のモニタリングによって疾病発生前の兆候を検知できる可能性があると考えられた。また、本病に感染したウナギ 1 尾から飼育水中に排出される細菌量は、1 日あたり最大 2.9×10^3 CFU/L \sim 9.8×10^3 CFU/L であった。さらに試験区 (1) においては、供試魚の回収後、飼育水中の細菌量が緩やかに減少する傾向が見られた。一方、第 6 回試験においては、供試魚の死亡は確認されたが、死亡数日前に細菌量の大幅な減少が見られていたことから、今後、当該手法の再現性を改めて確認する必要があると考えられた。

なお、試験期間中の飼育水の pH の推移は図 3 及び 4 の通りであり、細菌量の増減との関連性は見られなかった。

(2) 養鰻池における *E. anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリング

モニタリングを実施した 4 業者の養鰻池の pH、D₀、水温、塩分、アンモニア態窒素量、亜硝酸態窒素量、*E. anguillarum* 細菌量の推移は図 5～11 の通りであった。

細菌量については、1～3 月に A 業者の 2 池で 3.20×10^1 CFU/L \sim 7.31×10^1 CFU/L の *E. anguillarum* が検出され、qPCR によって養鰻池の飼育水中の *E. anguillarum* を検出できることが分かった。一方、その他の 3 業者では調査期間中を通じて *E. anguillarum* は検出されなかった。また、EZR を用いた Spearman の順位相関係数による統計解析の結果、細菌量といずれの水質にも相関は見られなかった。ただし、今回のモニタリング調査において、細菌量の増加が見られたのは A 業者の飼育池で延べ 3 回のみであったことから、水質との関連性を正確に把握できていない可能性が高いと考えられた。そのため、来年度の養鰻池のモニタリング調査については、調査対象をパラコロ病が頻発する業者の飼

育池のみとし、水質との関連性について、さらに検証を行う必要があると考えられた。

また、12月12日にA業者のモニタリング対象以外の飼育池2箇所（3番及び4番池）でパラコロ病が発生したため、3番池は12月12日から翌年1月3日まで、4番池は12月14日から翌年1月7日まで飼育水の採水を実施した。当該期間中の3番及び4番池における、飼育水中の細菌量及び死亡尾数の推移は図12及び図13の通りである。

まず、3番池については、疾病発生日の12月12日に 8.16×10^3 CFU/Lの細菌量が検出された。その後、急激な減少傾向が見られ、12月20日は 1.27×10^1 CFU/Lまで減少した。しかし、12月20日を境に増加傾向が見られ、12月28日には 1.68×10^2 CFU/Lまで増加した。1月1日に 1.46×10^1 CFU/Lまで減少したが、1月3日には再び増加傾向となった。一方、死亡尾数については1日ごとの増減があるものの、全体を通して見ると、12月12日から26日にかけて減少し、その後、増加傾向となった。また、4番池についても同様の傾向が見られ、細菌量については、疾病発生日の翌々日である12月14日に 5.58×10^3 CFU/Lが検出された。その後、急激な減少傾向が見られ、12月22日は 4.31×10^1 CFU/Lまで減少した。しかし、12月20日を境に増加傾向が見られ、1月5日には 3.89×10^3 CFU/Lまで増加した。一方、死亡尾数については全体を通して見ると、12月14日から20日にかけて減少し、その後、増加傾向となったが、1月1日から7日にかけては緩やかな減少傾向となった。なお、両池において、12月14日から20日頃にかけて、細菌量の急激な減少が見られていたが、A業者は12月14日から18日までの5日間、パラコロ病対策として水産用抗菌剤（フロルフェニコール製剤）の経口投与を行っており、この処置に伴い、罹患魚の排出菌量が減少したと考えられた。しかし、その後、細菌量及び死亡尾数が増加しており、パラコロ病が再発したと考えられた。*E. anguillarum* 含むエドワジエラ症の原因菌は宿主の食細胞（マクロファージ）内で生存、増殖することが知られており（飯田ら、2016）、水産用抗菌剤の投与効果が十分得られない可能性が指摘されている。そのため、投薬処置後に魚体内に残存した原因菌から再発した可能性が高いと考えられた。こうした事態の防止策として、早期の投薬処置の実施が考えられるが、本手法は薬剤耐性菌の発生に十分注意する必要がある。

以上の結果から、パラコロ病発生時の飼育水中の細菌量のオーダーは $10^3 \sim 10^4$ CFU/L程度であると考えられた。また、3番池については、死亡尾数が12月26日から増加していたが、飼育水中の細菌量は20日から増加しており、細菌量のモニタリングによって疾病発生前の兆候を検知できる可能性があると考えられた。しかし、4番池ではそういった傾向は明確には見られていなかったことから、前述の通り、来年度はパラコロ病が頻発する業者の飼育池を対象に細菌量のモニタリングを行い、細菌量と死亡尾数の増減について、さらに検証する必要があると考えられた。

【引用文献】

Kanda, Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 48. 452-458.

中城岳（2021）養鰻における疾病の早期検知技術の開発. 令和3年度事業報告書（事業報

告). 32.42-54.

飯田貴次、坂井貴光、高野倫一 (2016) : エドワジエラ症. 魚病研究, 51(3), 87-91.

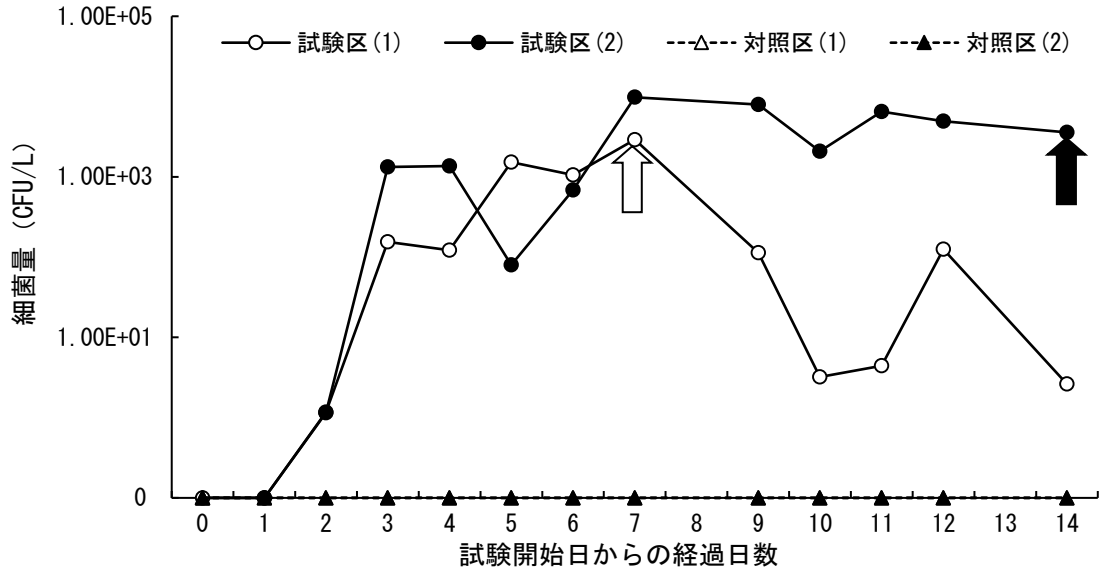


図1 第5回試験における試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移
(試験区の供試魚の死亡日を矢印で図示した。)

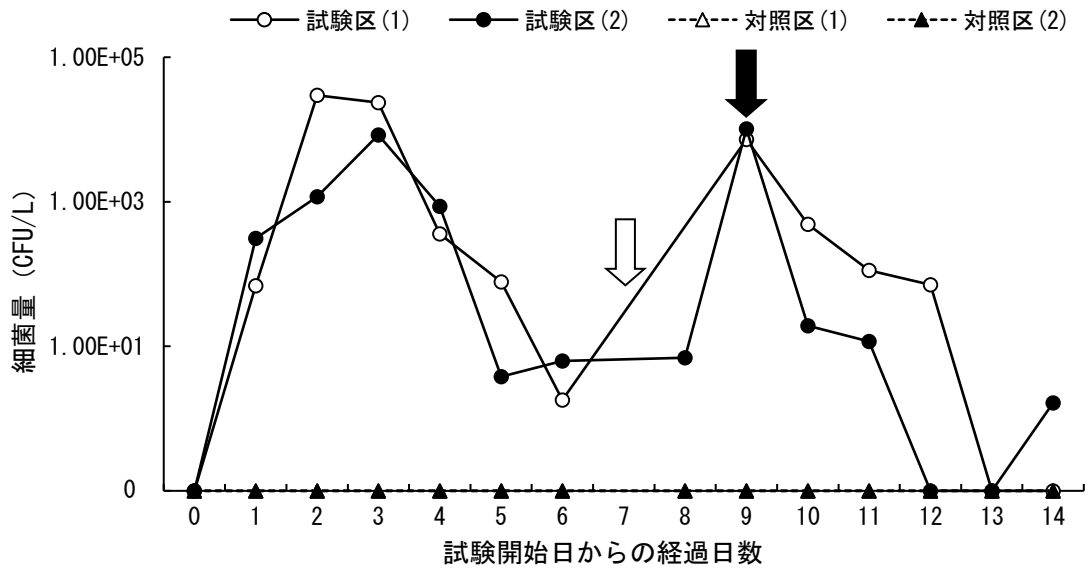


図2 第6回試験における試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移
(試験区の供試魚の死亡日を矢印で図示した。)

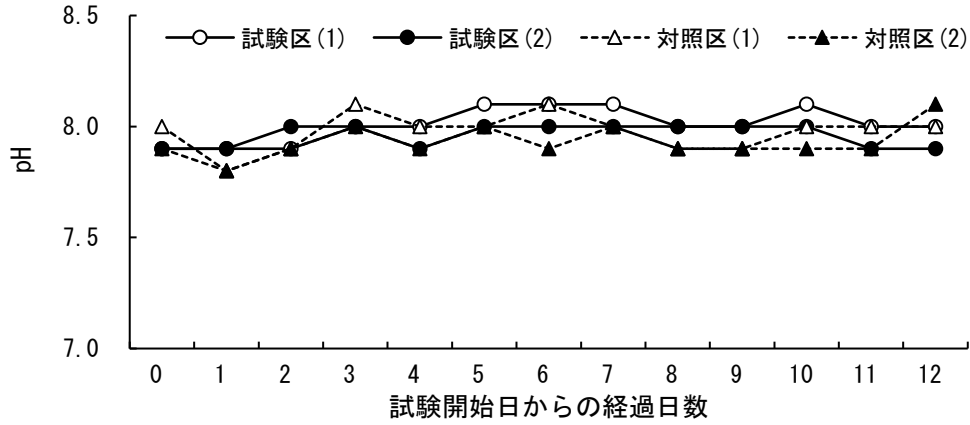


図3 第5回試験における試験期間中の飼育水中のpHの推移

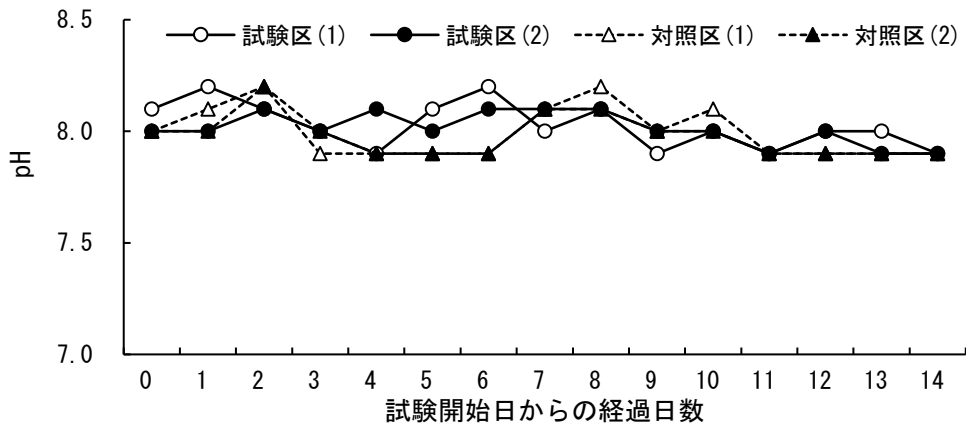


図4 第6回試験における試験期間中の飼育水中のpHの推移

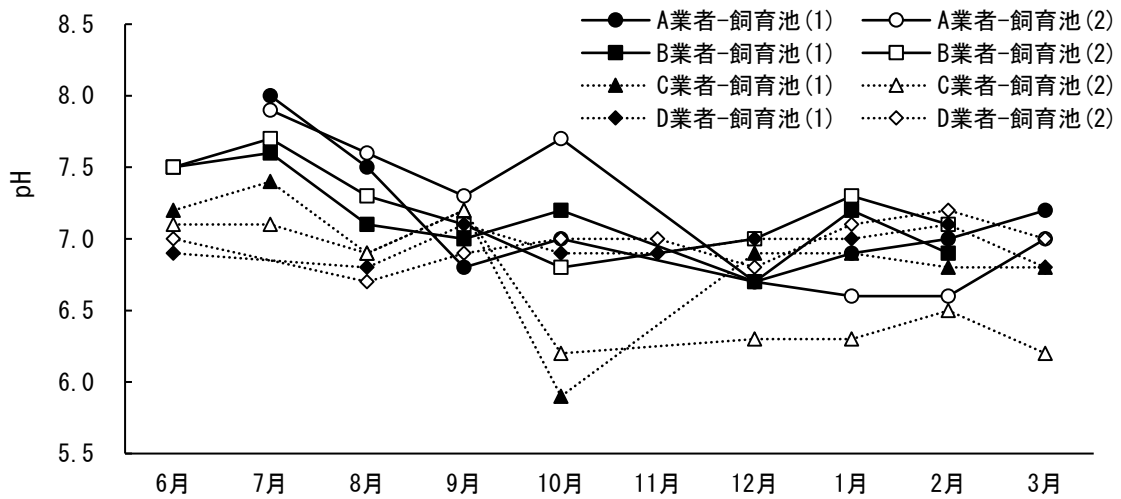


図5 モニタリング対象池におけるpHの推移

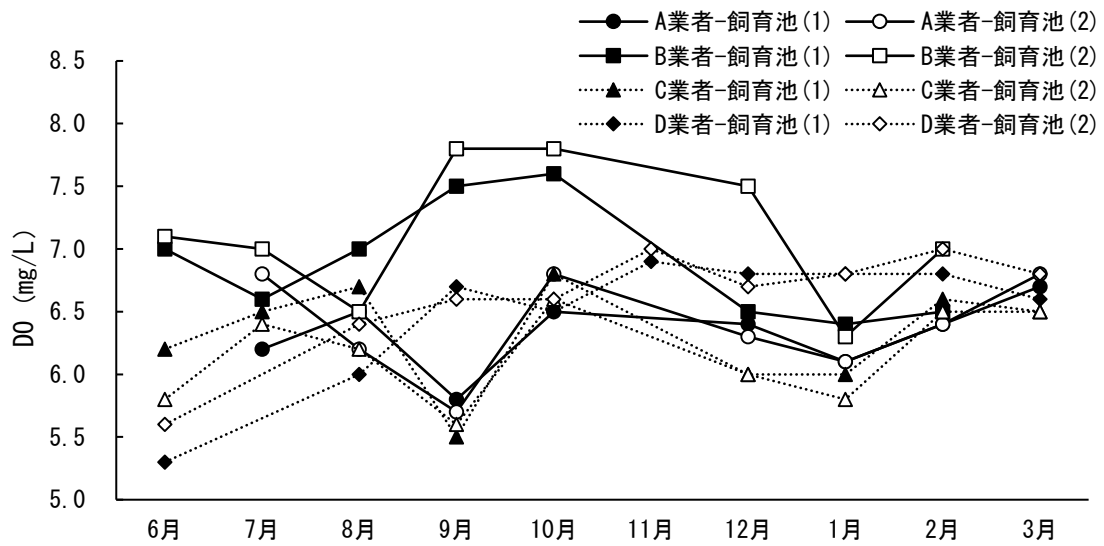


図6 モニタリング対象池におけるDOの推移

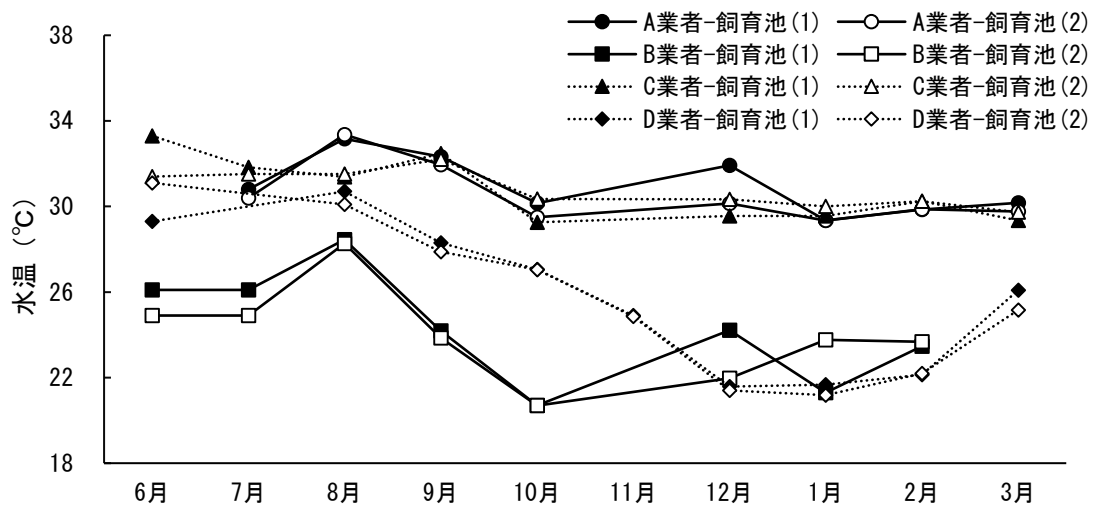


図7 モニタリング対象池における水温の推移

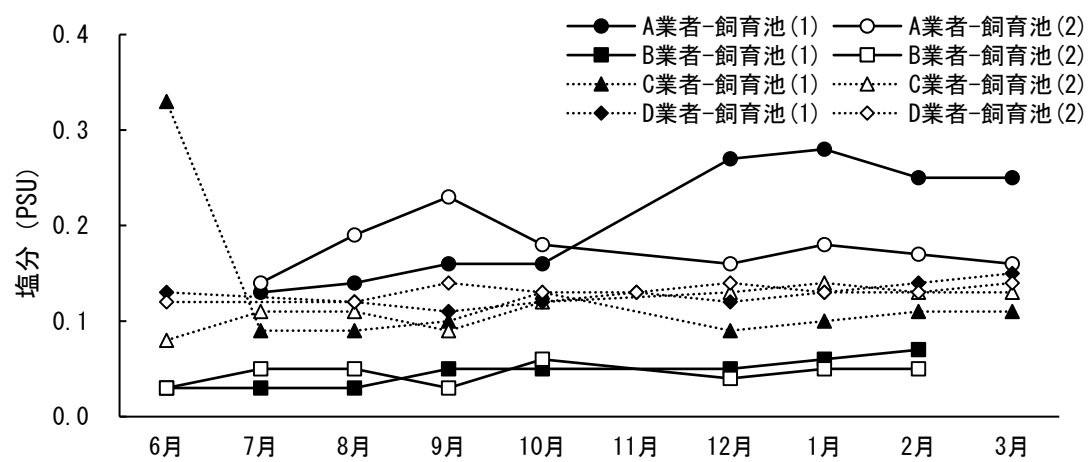


図8 モニタリング対象池における塩分の推移

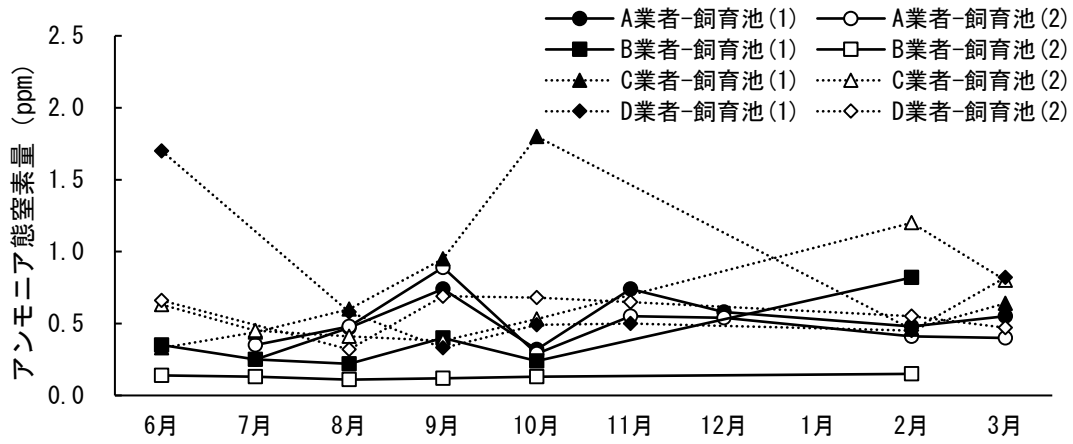


図9 モニタリング対象池におけるアンモニア態窒素量の推移

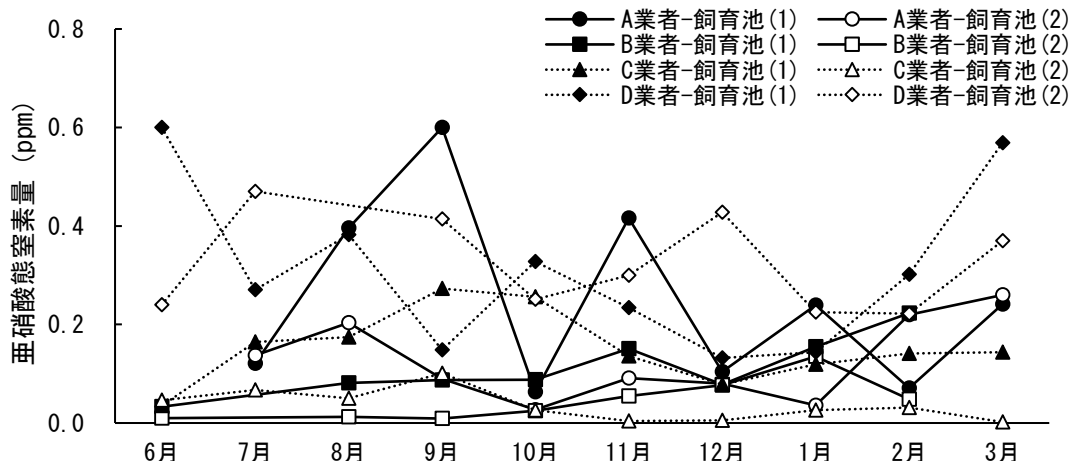


図10 モニタリング対象池における亜硝酸態窒素量の推移

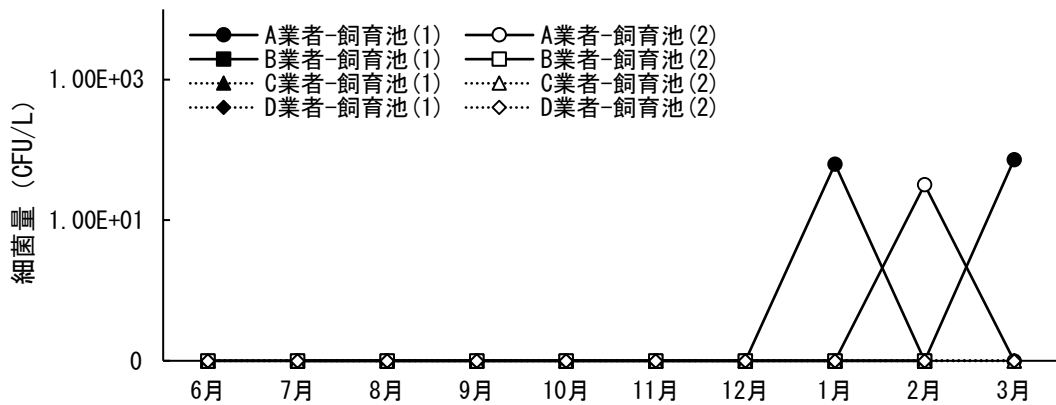


図11 モニタリング対象池における *E. anguillarum* 細菌量の推移

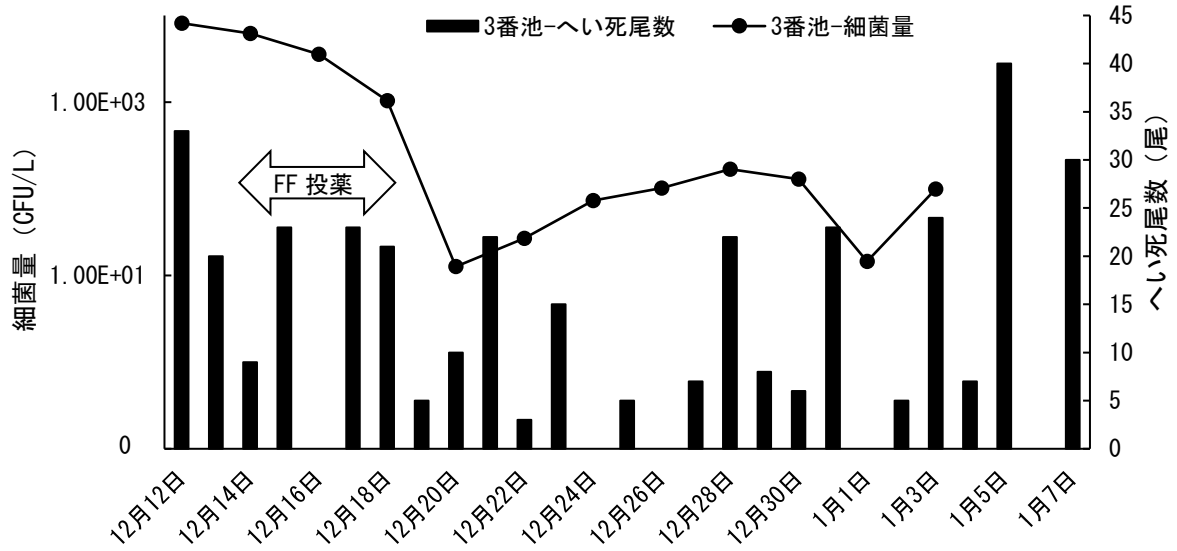


図 12 A 業者のパラコロ病発生飼育池（3 番池）における *E. anguillarum* 細菌量及びへい死尾数の推移

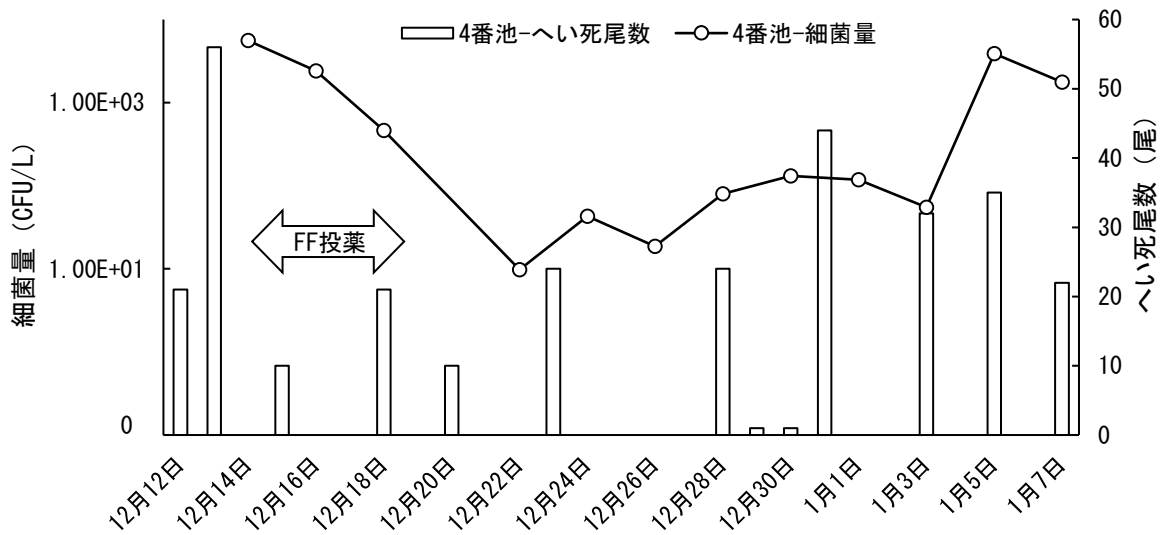


図 13 A 業者のパラコロ病発生飼育池（4 番池）における *E. anguillarum* 細菌量及びへい死尾数の推移

表 1 モニタリング対象業者の概要

業者名	パラコロ病発生歴	加温状況
A	有	加温（周年）
B	有	非加温（周年）
C	無	加温（周年）
D	無	非加温（冬期のみ加温）

表 2 浸漬感染法による感染試験結果概要

手法及び試験期間	試験回及び試験期間	試験区	供試魚No.	魚体重 (g)	死亡日 (経過日数)	症状	部位別検査結果			
							肝臓:L 腎臓:K	塗抹標本 観察結果	SS寒天培地による 菌分離結果	qPCR結果 (○:陽性、 ×:陰性)
浸漬感染法	第1回 令和4年11月10日 ~11月8日	試験区	①試験区(1)	83.0	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			①試験区(2)	78.2	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
		対照区	①対照区(1)	101.5	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			①対照区(2)	110.0	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
	第2回 令和4年12月5日 ~12月13日	試験区	②試験区(1)	38.2	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			②試験区(2)	36.5	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
		対照区	②対照区(1)	31.9	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			②対照区(2)	35.4	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
	第3回 令和4年12月21日 ~12月30日	試験区	③試験区(1)	54.3	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			③試験区(2)	47.8	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
		対照区	③対照区(1)	43.2	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			③対照区(2)	43.5	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
	第4回 令和5年1月12日 ~1月20日	試験区	④試験区(1)	114.2	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			④試験区(2)	91.5	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
		対照区	④対照区(1)	107.4	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			④対照区(2)	95.1	生存	症状なし	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-

表 3 腹腔内注射法による感染試験結果概要

手法及び試験期間	試験回及び試験期間	試験区	供試魚No.	魚体重 (g)	死亡日 (経過日数)	症状	部位別検査結果			
							肝臓:L 腎臓:K	塗抹標本 観察結果	SS寒天培地による 菌分離結果	qPCR結果 (○:陽性、 ×:陰性)
腹腔内注射法	第5回 令和5年2月20日 ~3月6日	試験区	⑤試験区(1)	78.5	2月27日 (7日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓の出血点	L 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	8.87E+01
			⑤試験区(2)	79.2	3月6日 (14日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓褐色	K 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	1.35E+01
		対照区	⑤対照区(1)	76.1	生存	症状なし	L 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	2.96E+02
			⑤対照区(2)	79.0	生存	症状なし	K 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	5.87E+02
	第6回 令和5年3月16日 ~3月30日	試験区	⑥試験区(1)	65.4	3月23日 (7日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓褐色	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
			⑥試験区(2)	77.8	3月25日 (9日目)	肛門突出、腎腫大	K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
		対照区	⑥対照区(1)	66.2	生存	症状なし	L 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	2.59E+02
			⑥対照区(2)	82.1	生存	症状なし	L 短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	○	1.49E+02
							K 短桿菌	中心黒コロニー出現	○	7.43E+02
			⑥対照区(2)	82.1	生存	症状なし	L 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×	-
K 細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	×					-			