



Title	サケマス採卵親魚の病原微生物検査法
Author(s)	吉水, 守; 野村, 哲一
Citation	魚と卵, 158, 49-59
Issue Date	1989
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39496
Type	journal article
File Information	yoshimizu-77.pdf



サケマス採卵親魚の病原微生物検査法

吉水 守・野村 哲一

I. 採卵親魚に対する病原体検査の必要性

自然界に生息している魚類は棲息密度も低く魚類を宿主とする病原微生物と遭遇する機会は少ない。しかし人工飼育条件下では飼育密度が高くなり、飼育環境中にひとたび病原微生物が侵入すると、短期間に感染の拡大が起こり大きな病害の発生に結びつきやすい。

病原微生物の魚類飼育環境への侵入経路としては飼育水、他の生物、飼育に使用する器具等多くの経路が考えられるが、主要な経路は不顕性感染魚(症状を現わさない感染魚)と考えられている(McCraw, 1962)。通常健康な魚類であれば種々の生体防御力により体内に進入した微生物は排除される。しかし生理状態の変化によっては体内で微生物が増殖し、魚体に異常を現わすとともに環境中にそれらの病原体を排泄して他の個体への伝播を引き起こす。特に採卵に供する成熟親魚は体を構成する主要な成分を卵に移し、栄養学的、生理学的にきわめて劣悪な状態にある。この時期に病原微生物の感染を受けると体内での増殖を許す結果となり、親魚の死亡ひいては採卵成績の悪化につながる。私共の過去10年以上にわたる調査の結果では、北海道内の主要河川の成熟親魚からせつそう病の原因菌 *Aeromonas salmonicida* をはじめ、魚類病原ウイルス IHNV, OMV, CSV などが分離されている(野村・木村 1981; 野村ら, 1983; 野村, 1984; 吉水ら, 1988)。親魚から卵を介して稚魚への垂直伝播の可能性が危惧されたが、幸いなことに適宜卵の消毒が効果的に実施され現在までのところ、さけ・ますふ化場では稚魚の被害は発生していない。また病原体の検出率も年々減少してきている。しかし親魚の検査やその後の対処を怠り、病原体が蔓延し重大な影響を来たしている所もある。アメリカ、カナダの太平洋岸では増殖対象魚種のマスノスケ、ギンザケの成熟親魚が細菌性腎臓病の原因菌を、またベニザケ親魚が IHNV を共に高率に保有していることが明かとなり、これらの病原体が資源量に大きな影響を与えていると考えられている(Fryer and Sanders, 1981; Grishkowsky and Amend, 1976)。

近年稚魚飼育尾数の増大、飼育期間の長期化、採卵親魚の催熟蓄養尾数の急激な増加さらに蓄養期間の長期化という状況のもと、親魚の蓄養はふ化場内の稚魚飼育池を兼用するか、河川水を利用する形態をとる場所が多くなっている。稚魚の飼育池を利用しての親魚の蓄養は、施設の効率的使用の点から利点も認められるが、先にも述べたように成熟親魚が種々の病原体を保有している事実が明らかになるにつれ、親魚から卵、稚魚への垂直伝播の可能性が危惧されている。親魚の蓄養は近年になって始められた事業形態であり、蓄養技術の改良試験も開始されたばかりである。蓄養効率の向上には、高品質の卵の確保と、親魚の使用効率の向上が具体的な改良項目として考えられている。しかしそのためには親魚の生理学的特性の解明による良質の種卵を確保する技術と、病害防除技術の開発という両面から親魚使用効率の向上を計ることが急務である。人における健康診断と同様、親魚の健康診断として既往症の把握と病原微生物保有の有無を調べておくことは病害防除対策上極めて重要な課題と考える。

近年魚類の病害防除に関する研究も目ざましい発展をとげ、従来は診断に長時間を要した疾病も蛍光抗体法や酵素抗体法により病原体の検出が可能となり、さらには、ELISA 法による抗体の検出など、确实迅速な診断が行われるようになってきた。しかし病原体の分離確認は診断の基本であり、その重要性は変わっていない。従来病魚からその原因菌を分離するには特殊な技能を必要とすると考えられ、魚病担当者にまかされていた。採卵親魚の健康調査を目的とした病原体保有状況の調査は、調査地点、調査尾数が増加の一途にあり、交通事情がよくなったとはいえ、魚病担当者だけのサンプリングは限界に達して来た。現場における病害対策は検査材料の採取に飼育担当者の協力が得られれば貴重なデーターをより多く得ることが出来ると考えられる。

私共は現在まで1万尾以上のサケ、カラフトマス、サクラマス親魚について魚類病原細菌や病原ウイルスの保有状況を調査し、採卵現場におけるこれらの病原微生物の分離法は調査を重ねるにつれ改良されてきた。現在行っている方法は基本的なことがらを守ってもらえば誰にでも実施可能な方法と考えている。ただし病原体を分離した後、その性状等を細かく検査するためには専門的な技術と機材が必要であり、やはり魚病担当者に任せる必要がある。

以下に採卵親魚の魚類病原ウイルスおよび細菌の検査法の概略を記し、採

卵現場の方々に協力をお願いするときの材料採取方法、培養方法および送付方法等を紹介したい。

II. 採卵親魚の病原体検査法の概略

魚類のウイルス病は一般に稚魚期に多く発生し、一旦病気が発生すると大きな被害を蒙る。感染しても生き残った魚はその後ウイルスを保有しキャリアーとなる。またあるものは症状を現わさないまま（不顕性感染）経過し同様にキャリアーとなる。これらキャリアー魚からは現在の技術をもってしてもウイルスを分離することはできない。しかし不思議なことにキャリアー魚が成熟期になると卵巣腔液（体腔液）中にウイルスが現われてくる。ウイルスにとっては種の保存上好都合であるが魚の側からすると卵を介して稚魚への感染の危険にさらされる。そこで採卵直前に親魚から体腔液を採取し（Yoshimizu et al., 1985）、病原ウイルスの有無を検査しておくことは、稚魚をウイルス病から守る上で極めて重要な意義を持つ。

一方魚類病原細菌は、親魚が生理学的にきわめて劣悪な状態になった時、宿主である親魚に侵入しやすくなる。蓄養条件の悪化等によってせっそう病の原因菌などがしばしば分離されている。病原細菌の分離は原則として魚体を消毒後、無菌的に解剖し、一般的には腎臓に白金耳を挿入し、平板培地上に塗抹して培養し細菌を分離する。本題の採卵親魚の場合は、魚体の大きさおよび採卵行程の流れから採卵後の魚体を使用せざるを得ない。通常の採卵作業では腎臓に傷はつかず、採卵後直ちに後述の方法により実施すれば無菌的に腎臓の細菌検査が可能である。

なお両検査とも、親魚の母数を無限大としたとき95%信頼でのサンプル数は60尾を必要とすると言う原則から60尾を対象に調査する。

III. 準備するもの

ウイルス検査

1. 抗生物質入り Balanced Salt Solution（Anti Ink と呼称）

採取した体腔液中に存在する細菌やカビの発育を抑え、その増殖能を輸送中に抑えてしまう。特殊な成分を必要とするため魚病担当者に依頼して作成してもらう。使用まで0℃に保存する。

2. 自動ピペットおよびチップ

体腔液を採取するための自動ピペットとそのチップ(写真1)。メーカーはどこのものでも可。チップは高圧滅菌可能なものを選ぶ。使用の都度チップを蒸留水でよく洗浄し、高圧滅菌しなければならないので、魚病担当者に依頼しその都度必要本数を入手する。

3. 遠心管

市販のディスポーザブル10ml 用遠心管を購入しておく。

4. 試験管立

遠心管を立てるためのもので市販されている。

5. 解剖用具

ピンセット。

6. 消毒用アルコール

カット綿に70%エチルアルコールを含ませたもの。蓋の密閉できる容器(100ml の広口ポリ瓶等)に作っておくとよい。消毒用アルコールは市販されている。

7. 消毒液

使用後のウイルス検査材料採取用のチップの消毒には次亜塩素酸ナトリウム液を100倍に希釈して使用。

細菌検査

1. 細菌分離用培地：

市販の普通寒天培地もしくはトリプトソイ寒天培地を使用する。これらの培地は粉末の状態で市販されているのでそのままでは使用できない。細菌の分離に使用可能な状態にするには高圧滅菌器や無菌操作が必要なので魚病担当者に依頼して平板培地を作成してもらうか、高価であるが市販の平板培地を購入する。古くなって培地が乾燥し始めているものは使用できない。

2. 綿棒

従来は病魚から臓器の一部を取るのに白金耳を使用していたが、時間と熟練を要することから、市販の滅菌綿棒の使用を勧めたい。

3. 解剖用具

ウイルスの項に同じ

4. 消毒用アルコール綿

ウイルスの項に同じ

5. 消毒液

細菌分離に使用した綿棒や手指などの消毒には、市販のオスバン液（塩化ベンザルコニウム液）を100倍に希釈して使用。使用後の器具は放置せず必ず消毒や滅菌処置をしてから廃棄する。

上記した必要用具のうち平板培地は輸送のことも考え、プラスチックシャーレを使用するのが望ましい。平板培地は一週間以上の保存は望ましくなく、使用の都度魚病担当者に連絡して送ってもらう。他の用具は保存が効くので何かのついでに入手して置くといよい。綿棒は1,000本単位で市販されている。平板培地は危険なものではないが、空気中や手指などの雑菌が侵入すると（写真5）、目的とする病原菌の発育を妨げたり、以後の病原菌分離の妨げとなることから、使用時まで蓋をあけない。また写真5のように使用前にすでに雑菌の発育が観察された場合には使用しない。

IV. 採卵親魚からのウイルス検査材料の採取法

1. 採卵直前に排卵腔に滅菌チップを挿入し（写真2）、体腔液を約1 ml採取する。十分に成熟した親魚であれば無色透明でやや粘りのある液体が容易に採取できる。
2. 体腔液を遠心管に移し（写真3）、等量の Anti Ink を添加してよく混合する。混液を5℃（冷蔵庫）に保管し、ただちにクール便（5℃）で魚病担当者の実験室へ輸送する。2日以内に到着することが望ましい。
3. 自動ピペットのチップは必ず1尾毎に新しいものと交換する。その際のチップのは他のもの（指など）に触れないように注意する。
4. 使用済みのチップには病原ウイルスが付着している可能性があるので使用後は消毒液につける。

V. 採卵親魚の腎臓からの細菌の分離法

1. 採卵後の魚体の腎臓（メフン）から鰾の膜ごと内臓を剥し、腎臓を露出させる（写真6）。腎臓の表面を消毒用アルコール綿でよく拭き取りきれいにする。アルコール綿は使用の都度新しいものを用いる。
2. 綿棒の両端にさわらないように取り出し、柄の先で腎臓に穴を開ける（写真7）。
3. 腎臓に開けた穴に綿棒を挿入し、腎臓の組織を綿棒に塗り付ける（写真8）。綿棒でかきとる試料は極少量で十分である。

4. 綿棒を図1のように平板培地に塗抹する。操作中は絶対に培地面やシャーレ内面に指などを触れない。
5. 材料を塗抹した平板培地はしっかり蓋をし（ビニールテープでシールするかテープで蓋を止める）、25℃以上の温度にならないようにして（産卵期ではまず問題にならないが）なるべく速やかに（2～3日以内）魚病担当者の実験室に輸送する。
6. 以上の操作は出来るだけ風の通らない室内で行う。
使用済みの綿棒には病原細菌やウイルスが付着している可能性があるので必ず消毒液の中に捨てる。

引用文献

- Fryer, J.L. and J.E. Sanders (1981) : Bacterial kidney disease of salmonid fish. *Ann. Rev. Microbiol.*, 35, 273-298.
- Grishkowsky, R.S. and D.F. Amend (1976) : Infectious hematopoietic necrosis virus : Prevalence in certain Alaskan sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 186-188.
- McCraw, B.M. (1962) : Furunculosis of fish. *U.S. Fish Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep. Fish*, 84, 87pp.
- 野村哲一・木村喬久 (1981) : 北海道内の主要河川に溯上するサケ (*Oncorhynchus keta*) カラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*) サクラマス (*Oncorhynchus masou*) ヒメマス (*Oncorhynchus nerka*) 親魚における *Aeromonas salmonicida* の保有状況. 魚病研究, 16, 69-74.
- 野村哲一・木村喬久・清水幾太郎・奈良和俊 (1983) : 千歳川におけるサケ (*Oncorhynchus keta*) 親魚からの *Aeromonas salmonicida* の検出, 催熟蓄養による検出率の変動. さけますふ化場研究報告, 37, 53-61.
- 野村哲一 (1984) : サケ (*Oncorhynchus keta*) サクラマス (*Oncorhynchus masou*) カラフトマス (*Oncorhynchus gorbuscha*) 親魚からの *Aeromonas salmonicida* の検出. さけますふ研報, 37, 63-65.
- Yoshimizu, M., T. Kimura, and J. R. Winton (1985) : An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.*, 47, 199-200.
- 吉水 守・野村哲一・栗倉輝彦・木村喬久 (1988) : 北日本におけるサケ科魚

類採卵親魚の魚類病原ウイルス保有状況について—昭和51年～昭和61年—
さけますふ研報, 42, 1-20.

(北海道大学水産学部微生物学講座)

(北海道さけ・ますふ化場調査課)

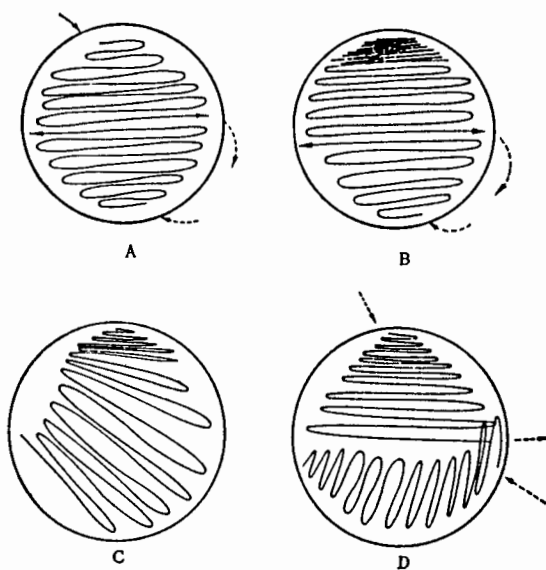


図1 平板培地への材料の塗抹法

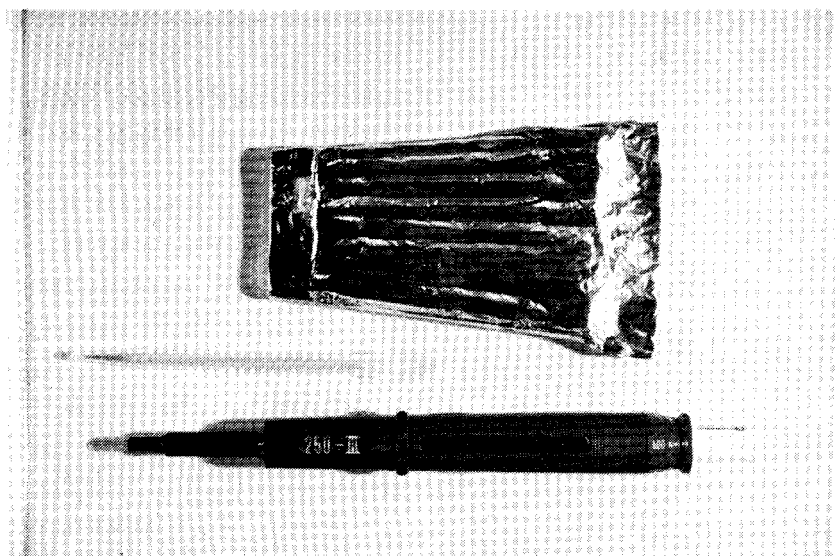


写真1 自動ピペットとチップ、チップはこのようにアルミ箔でくるみ滅菌する。

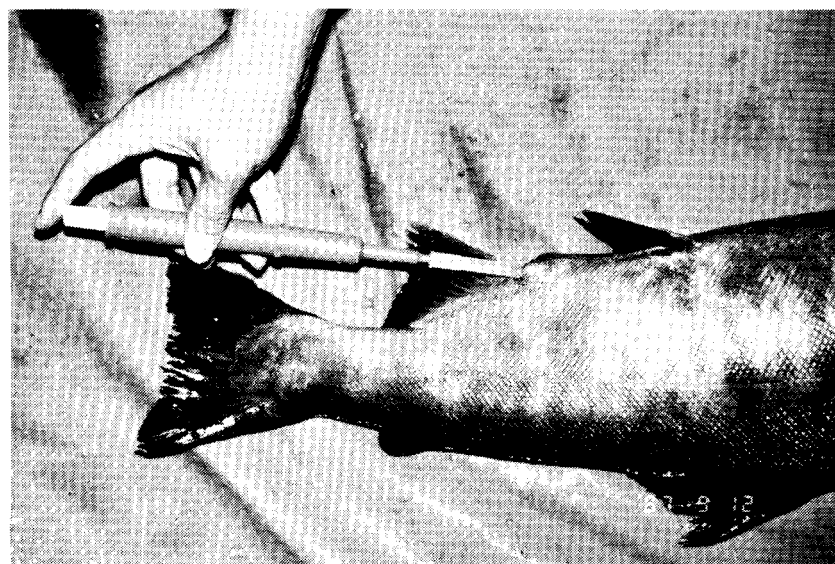


写真2 体腔液採取法、チップを排卵腔に挿入し約1 ml 採取する。

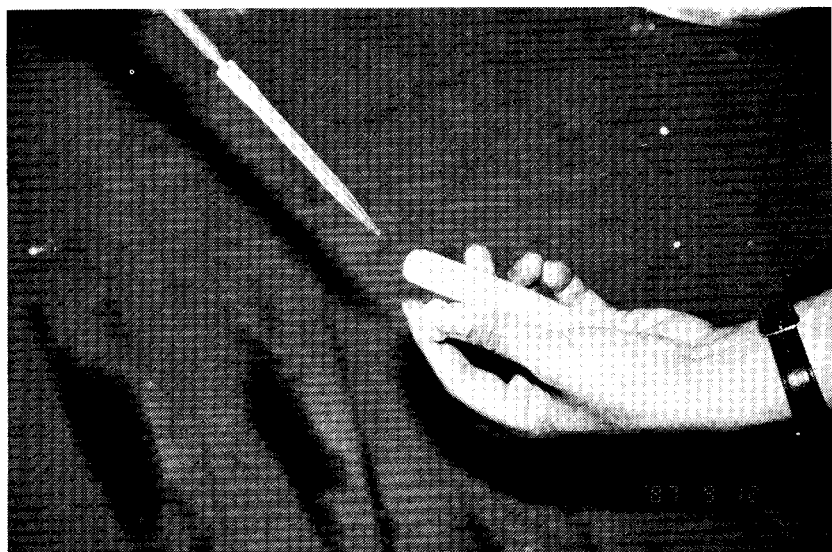


写真3 体腔液を遠心管に移しているところ。

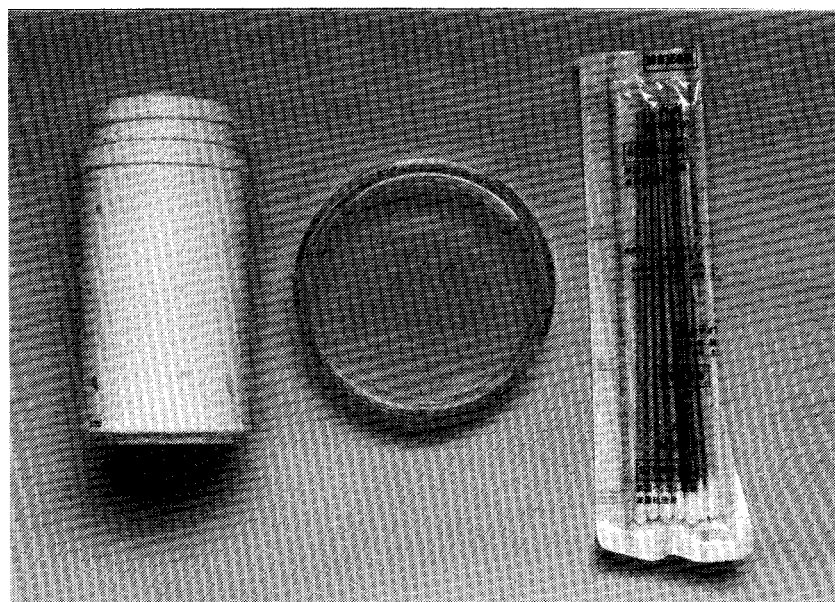


写真4 細菌の分離に使用する用具：左から アルコール綿，培地，綿棒

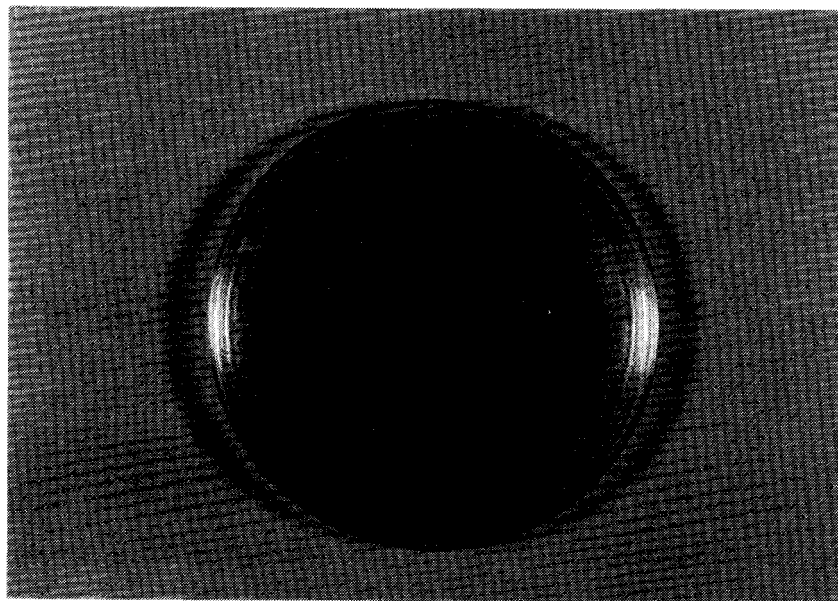


写真5 雑菌の入った平板培地，使用不可。

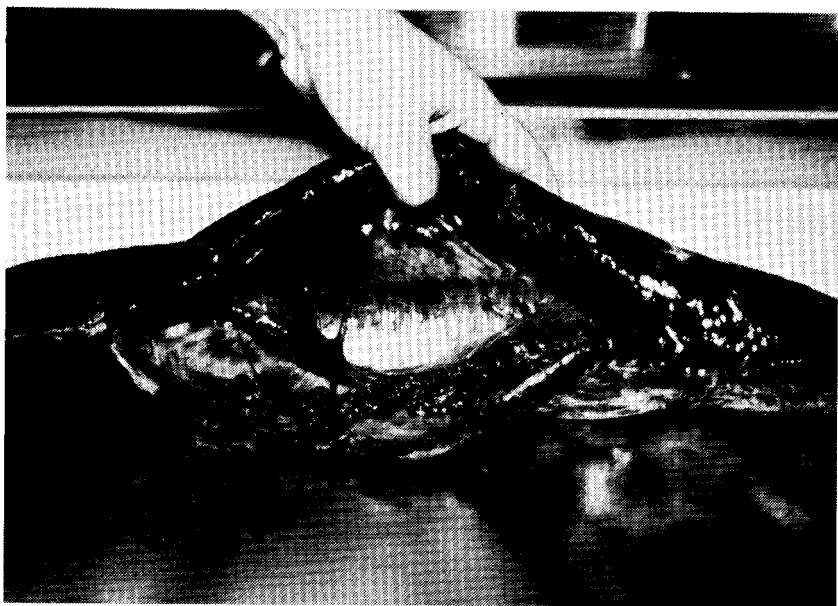


写真6 採卵後の魚体の腎臓をこのように露出させる。

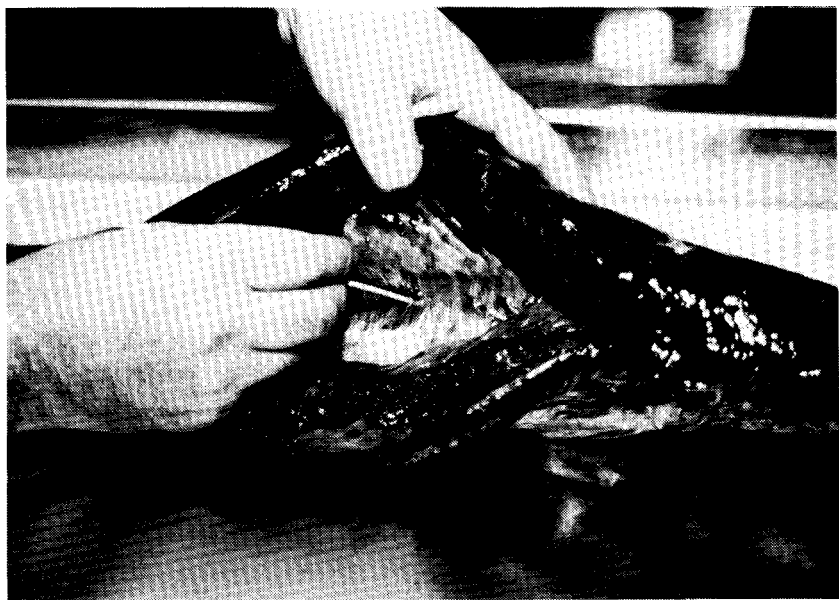


写真7 腎臓に綿棒の柄で穴を開けたところ。

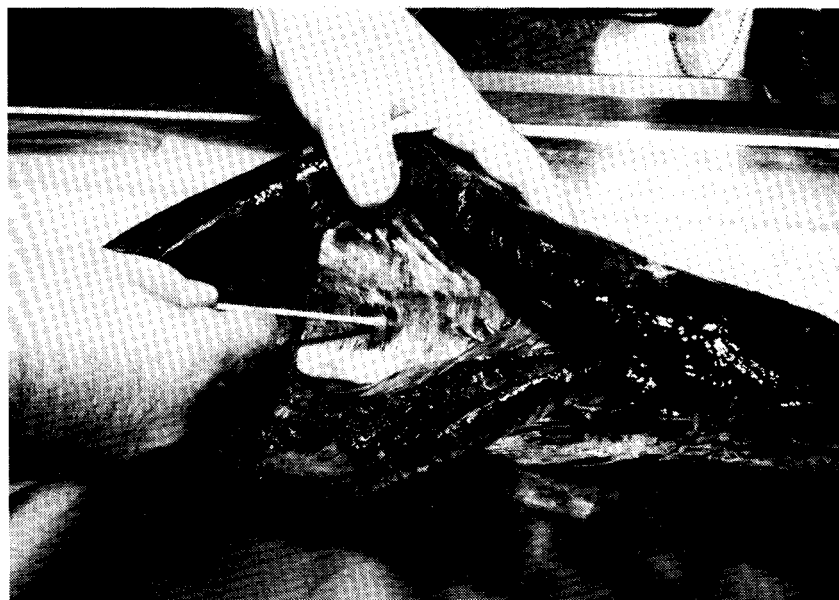


写真8 綿棒を腎臓に挿入し腎臓の一部を採っているところ。