

好適環境水による *Saprolegnia* 属偽菌類の菌糸成長抑制効果Effect of hyphal growth-depression of *Saprolegnia* spp. pseudofungi by The Third Water

糟谷 大河・北島 佑美・小濱 剛

Taiga KASUYA, Yumi KITAJIMA and Takeshi KOHAMA

水カビ病の主要な原因生物である *Saprolegnia* 属偽菌類を淡水圏から分離し、好適環境水および滅菌水中で培養した。培養試験では菌糸の発育状況を観察し、菌集落の大きさの変化を記録した。滅菌水で培養した *Saprolegnia* 属偽菌類の菌株では、培養開始22日後には同4日後と比較して、菌集落の大きさが減少したものが見られたが、変化のないものや成長したものも見られた。一方、好適環境水で培養した菌株では、培養開始22日後には同4日後と比較して、すべての菌株で菌集落の大きさが減少した。

1. はじめに

水カビ病 (*Saprolegniasis*) は、ストラメノパイル (不等毛類, Stramenopiles) に分類される原生生物の一群である卵菌門, ミズカビ目のミズカビ科に属する *Saprolegnia* Nees, *Achlya* Nees, *Aphanomyces* de Bary などの属の偽菌類によって引き起こされる魚類の感染症¹⁾である。水カビ病は、魚体あるいは魚卵に、外観的に綿毛状を呈する菌糸体が寄生繁茂する疾病で²⁾、菌糸体が魚体や魚卵内に侵入して養分を吸収する際、それらの浸透圧調整機能が破壊されるために死に至ると考えられている³⁾。また、健全な魚類が水カビ病に直接感染する例は少なく、体表に外傷が生じた際に傷口からミズカビ科偽菌類の遊走子が侵入することで発病することが知られている³⁾。さらに、魚体に形成されたミズカビ科偽菌類の菌糸体は、成長するとその先端に遊走子嚢と呼ばれる器官を形成し、そこから遊走子を放出することで他の個体に感染する^{1,2)}。

魚類養殖における水カビ病の被害については古くから知られており、日本では、1897年にコイの水カビ病が報告された

例⁴⁾がその端緒である。特に、水カビ病は淡水性の養殖魚に発生して大きな被害をもたらすことが知られ、1985年には宮城県内の養殖場で飼育されていたギンザケの50%が水カビ病により死亡した例⁵⁾がある。また、養魚池中のシラスウナギでは、給餌を開始して間もないころ、また、ときには無投餌で囲っている低水温期に、水カビ病が蔓延して大量に死亡することがある^{6,7)}など、ウナギの飼養においても本病は深刻な被害をもたらしている。

水カビ病の予防策および治療法としては、これまでマラカイトグリーンが用いられていたが⁸⁾、薬事法および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⁹⁾。そのため、水カビ病への新たな予防策や治療法が早急に求められている¹⁰⁾。そこで、本研究では好適環境水¹¹⁾に着目し、水カビ病の主要な原因生物である *Saprolegnia* 属偽菌類の成長抑制効果を検討した。

好適環境水とは、海水中に含まれる約60成分のうち、魚類の生育に最低限必要となる7種類の成分 (Na^+ , K^+ , Cl^- , Mg^{2+} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , Ca^{2+}) のみを用いて構成した低塩分濃度の人工飼育水であり¹¹⁾、淡水魚および海水魚の両者を飼育することが可能である。また、好適環境水中で飼育した魚類は魚病発生の危険性の低いことが経験的に知られている¹²⁾。このことから、好適環境水を用いた陸上養殖技術を確立することで、感染症発生のリスクを抑えた魚類の安定生産が可能になることが期待される。しかし、好適環境水中で魚

連絡先：糟谷大河 tkasuya@cis.ac.jp

千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科

Department of Environmental Risk and Crisis Management,
Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of
Science

(2018年10月1日受付, 2018年11月12日受理)

類病原菌の発生が抑制される要因は不明である。

これまでに、ニジマスの受精卵を低塩分濃度 (25ppt) の水中に一定時間浸漬させることで水カビ病の発生が減少し、孵化率も高まったという報告がある¹³⁾。このことから、同様に低塩分濃度である好適環境水を用いて魚類を飼育することで、水カビ病の発生抑制につながると推測される。しかし、このことを検証した研究はこれまでになく、好適環境水中で水カビ病の原因生物を培養し、どのような挙動を示すかを検討した例もない。

また、陸上における閉鎖型循環濾過飼育においては、飼育水の塩分濃度を最適に保持することは低予算で比較的容易に制御可能である¹⁴⁾ ことから、好適環境水の有効活用が期待される。したがって、水カビ病のような魚類の感染症をもたらす生物に対して、好適環境水がどのような影響を及ぼすのかを評価することはきわめて重要である。そこで本研究では、水カビ病の主要な原因生物である *Saprolegnia* 属偽菌類を淡水圏より分離するとともに、好適環境水中で培養し、菌糸の生育状況を観察した。

2. 材料および方法

2016年4月から6月にかけて、千葉県銚子市、いすみ市、勝浦市の用水路、ため池や水たまりにおいて採水を行った。野外より得た試料を実験室に持ち帰り、小川・室賀³⁾ に基づき、アサの実の子葉を用いて *Saprolegnia* 属偽菌類を分離した。分離された菌株について、菌集落の肉眼的・顕微鏡的な特徴を観察し、小林・今野¹⁵⁾ に基づいて同定を行った。顕微鏡的特徴については、菌糸体の一部を剃刀の刃を用いて切り取り、蒸留水またはラクトフェノール・コットンブルー液で封入し、光学顕微鏡の1000倍の倍率下で観察した。

その後、滅菌した蒸留水あるいは好適環境水を滅菌シャーレ中にそれぞれ分注し、分離された *Saprolegnia* 属菌の菌糸体と滅菌したアサの実の子葉を浮かべ、2016年7月8日から8月12日の間、25°Cの実験室内で培養し、菌糸体の形態の変化を観察した。培養期間内に、菌集落の直径を5回、すなわち培養開始日、培養開始から4日後、8日後、22日後、34日後に定規を用いて計測し、その変化から菌糸体の減少率を求めた。菌集落の乾燥を防ぐために、培養期間中、4日おきに滅菌水あるいは好適環境水をシャーレ中に継ぎ足した。また、培養試験中にアサの実の子葉以外の栄養分は添加しなかった。

なお、滅菌した蒸留水および好適環境水それぞれで培養した菌株の菌集落直径の変化について、培養開始日と培養開始から34日後の計測値を用いて、対応のある *t* 検定 (paired *t*-test) を行って統計的に検証した。

3. 結果および考察

野外より得た試料から 24 菌株が純培養的に分離された。これらの菌集落は綿毛状の菌糸体を形成した (図1)。分離された菌株について光学顕微鏡観察を行った結果、遊走子嚢 (図2) における遊走子の産生様式や、卵胞子の内部構造が垂中心位型であるなどの形態的特徴 (図3) に基づき、それらは *Saprolegnia* 属偽菌類であると同定した。

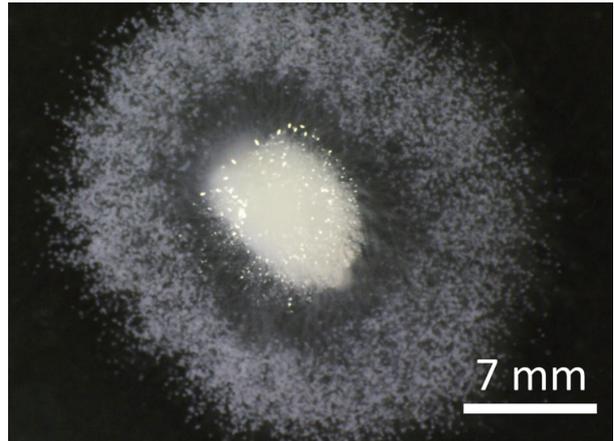


図1. 分離された *Saprolegnia* 属偽菌類の菌株。

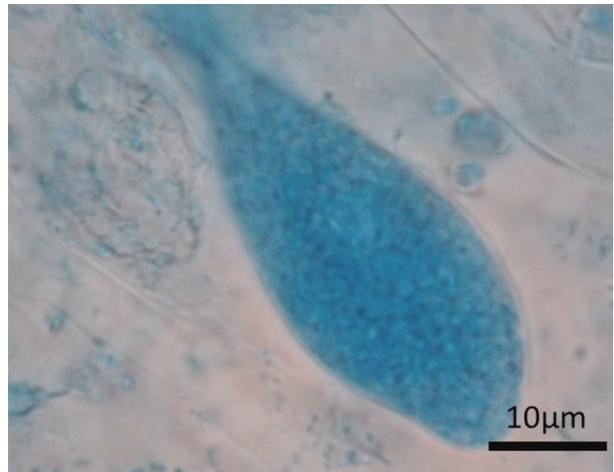


図2. 分離された *Saprolegnia* 属偽菌類の遊走子嚢 (ラクトフェノール・コットンブルー染色)。

分離された24菌株について、滅菌した蒸留水と好適環境水を用いた培養試験に各12菌株を供した。滅菌した蒸留水で培養した *Saprolegnia* 属偽菌類の菌株について、計測5回目 (培養開始34日後) では、同1回目 (培養開始日) と比較して、菌集落の大きさが減少したものが12菌株中、8菌株で認められた。一方、大きさに変化のないものが1菌株あったほか、菌糸体の成長が認められたものが3菌株認められた (表1)。滅菌した蒸留水で培養

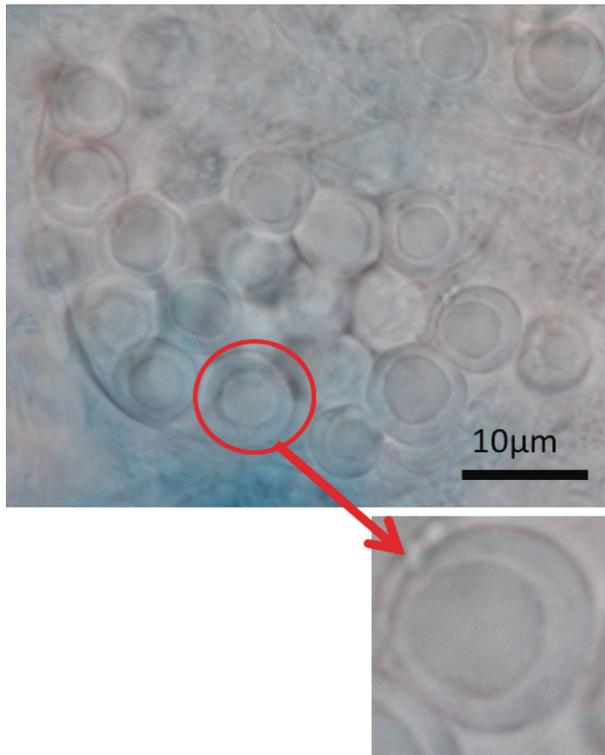


図3. 分離された*Saprolegnia*属偽菌類の造卵器と
その内部に形成された卵胞子
(円内、矢印はその拡大).

し、菌集落の直径が増大した菌株では、おおむね培養開始8日後以降から菌糸体の成長が認められ、計測4回目から5回目（培養開始22日後から34日後）では、菌集落全体が大きくなった。

一方、好適環境水で培養した*Saprolegnia*属偽菌類の

菌株では、計測1回目と5回目の比較により、すべての菌株で菌集落直径の減少が認められた（表1）。好適環境水で培養し、菌集落直径の減少率が最も高かった菌株（“好適環境水12”；表1）では、培養開始4日後にはアサの実の周囲の菌糸が剥落し始め、8日後では菌糸がほぼアサの実から脱落しかけており、22日後にはアサの実の周囲がゼリー状に変化した（図4）。

なお、対応のある*t*検定を行った結果、滅菌した蒸留水で培養した菌株では、計測1回目と5回目の菌集落直径の値（表1）に有意な差は認められなかった（ $p = 0.1150 > 0.05$ ）。一方、好適環境水で培養した菌株の菌集落の直径（表1）は、計測5回目において同1回目よりも有意に減少した（ $p = 0.0019 < 0.01$ ）。

以上のように、好適環境水と滅菌した蒸留水を用いた*Saprolegnia*属偽菌類の培養性状の観察結果、およびそれらの菌集落直径の計測結果から、好適環境水は*Saprolegnia*属偽菌類の菌糸成長抑制効果を持つ可能性が示唆された。

謝辞

供試菌株の分離試験に際してご協力いただいた、千葉科学大学大学院危機管理学研究科の渡辺丈洋氏に深謝する。また、好適環境水をご提供いただいた千葉科学大学危機管理学部の山口太一助教、ならびに本報告をまとめるにあたりご助言を賜った千葉科学大学危機管理学部の縫村崇行講師にお礼申し上げる。本研究は、文部科学省平成28年度私立大学研究ブランディング事業のタイプA『「フィッシュ・ファクトリー」システムの開発及び「大学発ブランド水産種」の生産』の成果の一部であり、研究費を助成いただいたことに感謝申し上げます。

表1. 滅菌した蒸留水と好適環境水を用いて培養した*Saprolegnia*属偽菌類の菌集落直径の計測値とそれらの減少率。

菌株番号	計測1回目* (cm)	計測5回目** (cm)	減少率 (%)	菌株番号	計測1回目* (cm)	計測5回目** (cm)	減少率 (%)
滅菌水 1	0.9	1.3	-44.4	好適環境水 1	0.5	0.4	20.0
滅菌水 2	0.9	0.7	22.2	好適環境水 2	0.7	0.4	42.9
滅菌水 3	1.0	0.9	10.0	好適環境水 3	0.8	0.6	25.0
滅菌水 4	1.0	0.8	20.0	好適環境水 4	0.9	0.7	22.2
滅菌水 5	1.0	0.7	30.0	好適環境水 5	0.9	0.8	11.1
滅菌水 6	1.0	1.0	0	好適環境水 6	1.0	0.9	10.0
滅菌水 7	1.0	0.7	30.0	好適環境水 7	1.2	0.8	33.3
滅菌水 8	1.1	1.2	-9.1	好適環境水 8	1.2	0.5	58.3
滅菌水 9	1.1	0.8	27.3	好適環境水 9	1.3	1.1	15.4
滅菌水 10	1.2	1.0	16.7	好適環境水 10	1.4	0.8	42.9
滅菌水 11	1.2	0.9	25.0	好適環境水 11	1.7	1.2	29.4
滅菌水 12	3.2	3.3	-3.1	好適環境水 12	2.0	0.8	60.0
平均	1.3	1.1	14.7	平均	1.3	0.8	31.4

*計測1回目は培養開始日を示す。 **計測5回目は培養開始から34日後を示す。

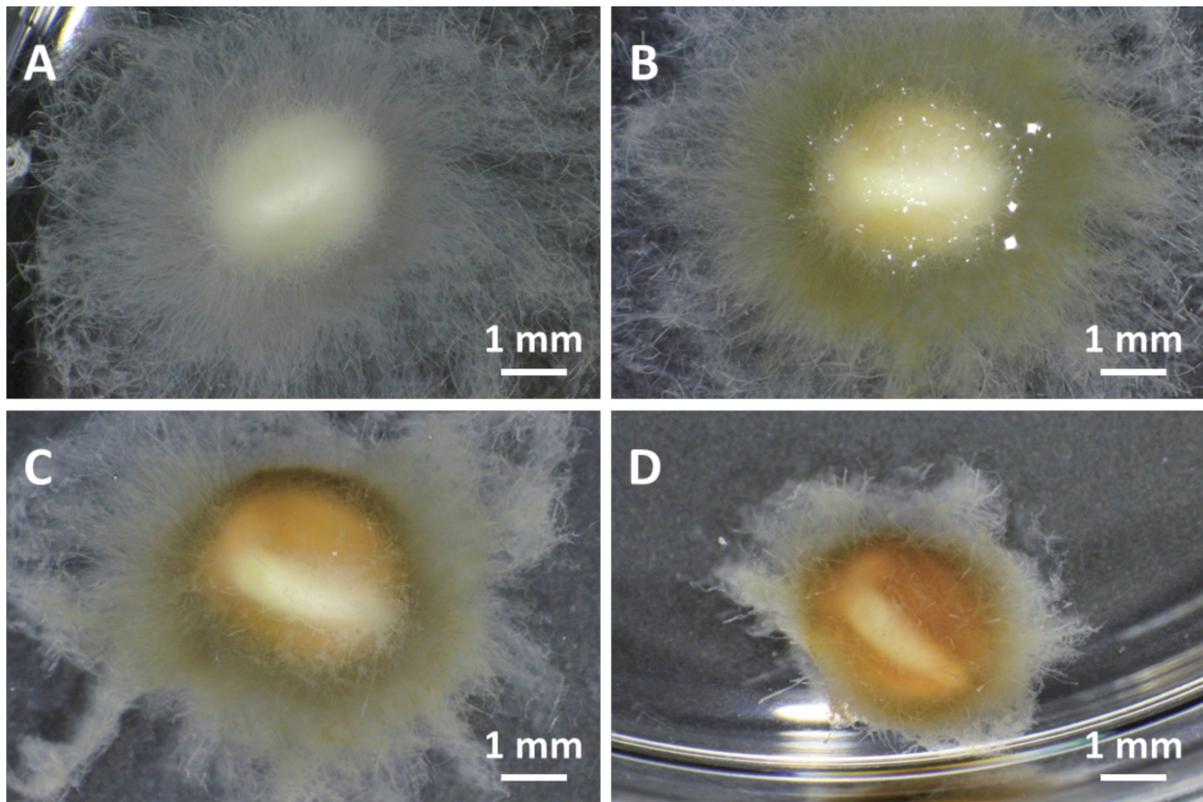


図4. 好適環境水で培養した*Saprolegnia*属偽菌類の菌集落の形態変化。
A: 培養開始日, B: 培養開始4日後, C: 同8日後, D: 同22日後.

引用文献

- 1) 畑井喜司雄, 江草周三: 魚類寄生ミズカビ. 魚病研究, 11, 45-56, 1976.
- 2) 畑井喜司雄: 水カビ病について. 魚病研究, 14, 199-206, 1980.
- 3) 小川和夫, 室賀清邦編: 改訂・魚病学概論. 恒星社厚生閣, 東京, 2012.
- 4) 松原新之助: 鯉病調査. 大日本水産会報, 178, 206-207, 1897.
- 5) Hatai K, Hoshiai G: Saprolegniasis in Cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Fish Pathology, 27, 233-234, 1992.
- 6) 江草周三: ウナギの水生菌病に関する研究-I. 水生菌感染に対する抵抗性について. 日本水産学会誌, 29, 27-36, 1963.
- 7) 江草周三: シラスウナギの水カビ病の研究中間報告. 魚病研究, 1, 23-36, 1966.
- 8) 野口博, 角皆英明: マラカイトグリーンによる鰻の水生菌治療について. 水産増殖, 5, 40-48, 1958.
- 9) 松岡栄一, 清水延浩, 神澤裕平: ヤマメ種苗生産における水カビ病対策. 群馬県水産試験場研究報告, 12, 30-32, 2006.
- 10) 三浦正之, 大野平祐, 土田奈々, 畑井喜司雄, 桐生透: 銅ファイバー浸漬によるニジマス卵のミズカビ病の防除. 魚病研究, 40, 81-86, 2005.
- 11) 加計学園, SID 創研 (出願人), 山本俊政 (発明者): 人工飼育水. 特願2006-328673/特許第5062550号, 2006-12-5.
- 12) 山本俊政: 好適環境水が拓く未来の養殖! : 山村を漁村に. 耐火物, 65, 107, 2013.
- 13) Kitancharoen N, Ono A, Yamamoto A, Hatai K: The fungistatic effect of NaCl on rainbow trout egg Saprolegniasis. Fish Pathology, 32, 159-162, 1997.
- 14) Riche MA, Pfeiffer TJ, Wills PS, Amberg JJ, Sepulveda MS: Inland marine fish culture in low salinity recirculating aquaculture systems. Bulletin of Fisheries Research Agency, 35, 65-75, 2012.
- 15) 小林義雄, 今野和子: 日本産水棲菌類図説. 鳥海書房, 東京, 1986.

Effect of hyphal growth-depression of *Saprolegnia* spp. pseudofungi by The Third Water

Taiga KASUYA, Yumi KITAJIMA and Takeshi KOHAMA

*Department of Environmental Risk and Crisis Management, Faculty of Risk and
Crisis Management, Chiba Institute of Science*

Saprolegnia spp., a main causal organism of Saprolegniasis were isolated from freshwater and cultured in sterilized freshwater and The Third Water. Hyphal growth of isolated cultures was observed, and changes of colony sizes were recorded. Although reduction of colony sizes were recognized in several cultures cultivated by sterilized freshwater, cultures increasing of those sizes were also observed. On the other hand, hyphal growth was reduced in all colonies cultured by The Third Water.