

水面からの紫外線照射による養鱒用水の殺菌と その魚病予防効果

佐々木 治雄・本西 晃・武居 薫

Disinfection of trout-rearing water by outer Ultraviolet
irradiation and the effects on control of diseases

Haruo SASAKI, Akira MOTONISHI and Kaoru TAKEI

本県においてIHN（伝染性造血器壊死症）が1974年1月に発生して以来、養鱒用水のほとんどはIHNウイルス（IHNV）に汚染され、種苗生産にはウイルス汚染のない用水が必要とされるに至った。長野県内では1987年にニジマス、イワナ等のサケ科魚類の稚魚が8,479万尾生産されており（長野水試1989）、その水源としては、地下水、あるいは山間地の湧水や沢水等が主に使用されている。しかし、地下水はさく井および揚水の経費がかかることや地域によってはさく井の規制がある。また、山間地の用水は地理的に不便であることに加え、多雪地帯であることが多く管理が困難である。一方、水質的には良好であるが、IHNVの汚染があるために種苗生産に使えない湧水等の用水が各地に存在しており、その多くはIHN発生以前には種苗生産に使用されていたものである。本試験は、このような用水を紫外線照射により殺菌して種苗生産に使用可能とすることを目的として実施した。

紫外線による魚類病原体の殺菌効果については、これまでにウイルス、細菌、原生動物等に対して基本的な殺菌線量が報告されている。さらに実際に市販の紫外線流水殺菌装置を用いて魚病発生予防効果を検討した報告として、本邦においては、IPN（伝染性膀胱壊死症）を対象として家坂・岡崎（1970）、牛山ら（1973）、花田（1975）、東京都水試（1976）、卵の水カビ着生防止を目的に木村（1980b）が試験を行っている。

紫外線照射装置としては、水の殺菌用にいわゆる内照式の機種が多く市販されており、殺菌効率は高いものの耐圧構造、二重管式ランプの採用のため一般に高価であることが難点である。その点、空気殺菌用の殺菌灯及び器具は設備費、維持費が安価とみられ、これらを使用して水面上から照射する外照式の紫外線照射装置であれば養殖事業場への導入は可能と考えられる。そこで、外照式装置での基本的な殺菌効果について、魚病細菌の*Aeromonas salmonicida* を用いて検討を行い、さらに紫外線照射処理した用水によりニジマス稚魚の飼育試験を行い魚病発生予防効果について検討を行った。

本文に入るに先立ち、紫外線殺菌について有益な御助言を頂き且つ文献の提供に心よく応じて頂いた北海道大学教授木村喬久博士、同大学助手吉水守博士に深謝の意を表します。

なお、本研究は水産庁委託事業の昭和56, 57, 58年度魚病対策技術開発研究の成果をとりまとめたものである。

I *Aeromonas salmonicida* に対する紫外線殺菌効果

実験 1. 止水状態における殺菌効果

材 料 と 方 法

紫外線照射方法 15Wの殺菌灯（東芝G L 15）1灯を反射用器具（東芝G R 1512）にとり付け、これを水槽の底面から20cmの高さに固定し菌液の上から照射を行った。菌液を入れる水槽は青灰色の硬質塩化ビニール製で、長さ40.0 cm、幅15.0 cm、高さ10.5 cmである。菌液の深さは10.0 cm（水容量6 ℓ）とし、実験中は底に磁気回転子を2個入れて菌液の攪拌を行った。

供試菌液の調整 供試菌株は1979年長野県内のヤマメ病魚から分離した*A. salmonicida* で、トリプトソイ寒天平板で20℃、2日間培養して得たコロニーを生理的食塩水に所定量懸濁して供試菌液を調整した。実験時の水温は12℃、室温は15℃であった。

殺菌効果の判定 殺菌効果は所定時間照射後の菌液中の生菌数の減少により判定を行った。生菌数は菌液水槽の中層から採取した菌液0.1 mlをトリプトソイ寒天平板に塗抹して、20℃、72時間培養後のコロニー数により求めた。なお、採取菌液は生理的食塩水による希釈を適宜行って平板へ塗抹した。

結 果

止水中の*A. salmonicida* に対して行った15Wランプによる紫外線照射実験の結果を表1に示した。

表 1. 紫外線照射による止水中の*A. salmonicida* の殺菌効果

照射時間 (秒)	1		2		3	
	生菌数 (N/ml)	殺菌率 (%)	生菌数 (N/ml)	殺菌率 (%)	生菌数 (N/ml)	殺菌率 (%)
0	1.8×10^6		2.8×10^6		4.7×10^7	
2	6.8×10^3	96.22	4.8×10^6	82.86	9.2×10^6	80.43
5	8.0×10^2	99.96	4.3×10^4	98.46	6.8×10^5	98.55
10	0	100.00	4.2×10^2	99.85	3.7×10^3	99.992

照射前の菌数を $10^5 \sim 10^7$ / mlのオーダーで実験したが、いずれも時間の経過とともに菌数は減じた。特に最も菌数の少ない 1.8×10^6 / mlでは10秒間照射で菌数は0となった。この結果をもとに供試菌に対する殺菌率を求めると、10秒間の照射では99.85～100%の殺菌率となる。

実験 2. 流水状態における殺菌効果

材 料 と 方 法

紫外線照射方法 殺菌灯と反射用器具は実験1と同じで、表2に示したA、B、Cの3装置を用いて実験した。Cは図1に示したようにランプ5本を横並べて直列に配置した。いずれの流水路も、注水によって生じる気泡や波立ちを抑えるため、せきと波よけ板を上流部に取付けた。装置への流入水は当場の養鱒用水である。

表 2. 流水状態における実験の紫外線照射装置

	殺菌灯		流 水 路			材 質	流水量 (ml / s)
	使用数 (本)	高さ※1 (cm)	長 さ (cm)	幅 (cm)	高 さ (cm)		
A	1	10	150	10	10	木製※2	1000 ~ 4000
B	1	20	150	15	20	木製※2	5000 ~ 9000
C	5						

※ 1 水路底から殺菌灯までの高さ

※ 2 反射効率を高めるため水路内側へアルミ箔を張りつけてある。

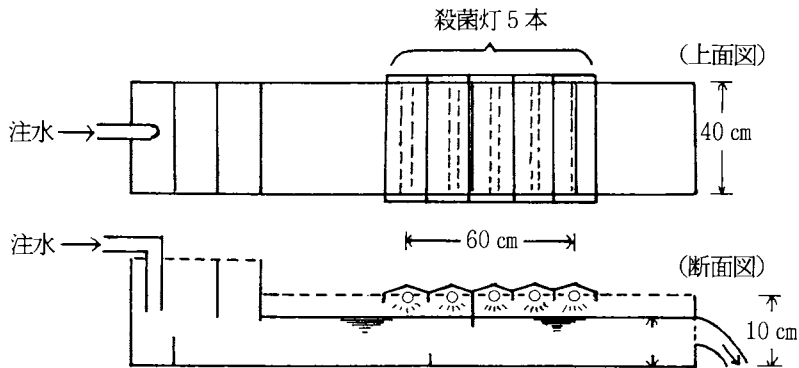


図1. 流水状態における実験 C の紫外線照射装置

供試菌液の調整 照射装置 A, B の実験に用いた菌株は実験 1 と同じであり, 同じく C の菌株は 1983 年に長野県内のアマゴ病魚から分離した *A. salmonicida* で, 前者はトリプトソイブイオン (ニッスイ), 後者はハートインフュージョンブイオン (ニッスイ) を用いて 20°C, 48 時間培養し, 菌数 10^8 / ml 前後の菌原液を作った。この菌原液を照射装置への流入水へ 10^4 / ml 前後の菌数となるように滴下混入した。流量は毎秒 1,000 ~ 9,000 ml の 8 段階で実験を行ったが, A の装置で 1,000 ~ 4,000 ml, B の装置で 5,000 ~ 9,000 ml, C の装置で 5,000 ml である。また, C の装置では流量を毎秒 5,000 ml と一定にし, 点灯ランプ数を 1 ~ 5 本に変えて実験を行った。なお, 実験時の水温は 7 ~ 8°C, 気温は 7 ~ 11°C であった。

殺菌効果の判定 殺菌灯照射前と照射後の水を下層から各 2 回採取し, 照射装置 A, B は 0.05 ml, C は 0.1 ml をトリプトソイ寒天平板へ塗抹した。平板の培養条件, 効果判定は実験 1 と同じである。なお, 平板上に出現した褐色色素産生のないコロニーは供試菌ではなく, 試験用水に含まれる一般水中細菌として計数した。

結 果

流水中の *A. salmonicida* に対して行った紫外線照射実験の結果を表 3 に示した。15W ランプ 1 灯を用いた A, B の装置では, 1,000 ~ 5,000 ml / 秒の流量で 10^4 / ml のオーダーの菌が 0 に減じ 100 % 殺菌され, 7,000 ~ 9,000 ml / 秒では流量の増加に従い殺菌率は低下し, 9,000 ml / 秒では殺菌率 98.43 % となった。

表3 紫外線照射による流水中の*A. salmonicida*の殺菌効果

照射装置 記号	使用ランプ 数(本)	流量 (ml/s)	<i>A. salmonicida</i>			一般水中細菌		
			照射前 菌数 (1 ml中)	照射後 菌数 (1 ml中)	殺菌率 (%)	照射前 菌数 (1 ml中)	照射後 菌数 (1 ml中)	殺菌率 (%)
A	1	1,000	5.0×10^4	0	100.0	1.4×10^3	20	98.6
	1	2,000	5.0×10^4	0	100.0	1.4×10^3	40	97.1
	1	3,000	4.9×10^4	0	100.0	1.4×10^3	20	98.6
	1	4,000	4.9×10^4	0	100.0	1.4×10^3	80	94.3
B	1	5,000	2.7×10^4	0	100.0	1.8×10^3	150	91.7
	1	7,000	2.5×10^4	60	99.76	2.1×10^3	260	87.6
	1	8,000	2.3×10^4	180	99.22	1.8×10^3	430	76.1
	1	9,000	2.3×10^4	360	98.43	1.8×10^3	1,800	0
C	1	5,000	4.1×10^3	0	100.0	930	415	55.4
	2	5,000	4.1×10^3	0	100.0	930	210	77.4
	3	5,000	4.1×10^3	0	100.0	930	73	92.2
	4	5,000	4.1×10^3	0	100.0	930	33	96.5
	5	5,000	4.1×10^3	0	100.0	930	25	97.3

次に、流量を5,000 ml/秒と一定にし、ランプの使用本数を1~5本に変えたCの装置では、 4.1×10^3 /mlの供試菌はいずれも照射後に0となり殺菌率100%となった。

なお、流入水中にすでに含まれていた一般水中細菌はAの装置の1,000 ml/秒の流量で殺菌率98.6%、Bの装置の5,000 ml/秒の流量で殺菌率91.7%と紫外線感受性が供試菌より低い傾向を示した。

II 飼育池用水の紫外線照射による魚病予防効果

実験3. 人為的なIHN発病用水に対する紫外線照射

材 料 と 方 法

紫外線照射装置 15Wの殺菌灯(東芝GL15)2灯を反射用器具(松下電工吊下型)にとりつけて、塩ビ製流水路(長160cm×幅14cm×高14cm)上に水路底から14cmの高さに直列に設置した。この装置に100 ml/sの水を水深1cmで流下させた。

供試魚および実験区 供試魚はIHN汚染のない環境で飼育した平均体重0.15gのニジマス稚魚を1区当たり500尾用いた。飼育水槽は65ℓの塩ビ製で、水槽等の施設は予め消毒して用いた。飼育用水は湧水であり、実験中の水温は9.4~12.5℃であった。

実験区は感染区、照射区、非照射区を図2のように設定した。感染区では人為的にIHNの感染を行った供試魚を飼育し、感染区からのIHNウイルスを含む200 ml/sの排水を2等分し、照射区には紫外線照射した用水、非照射区は照射しない用水を注水して、それぞれ45日間の飼育を行った。感染区の供試魚の感染方法は、感染価 $10^{3.5}$ TCID₅₀/mlに調整したIHNVの感染用希釈液5ℓに供試魚を1時間浸漬して行った。浸漬時の水温は10.6℃であった。

なお、紫外線照射装置の殺菌性能を検討するため実験開始に先だち、*A. salmonicida*の 6.6×10^4 /mlに調整した菌浮遊液を50~300 ml/s流下させて菌数の変化を調べた。

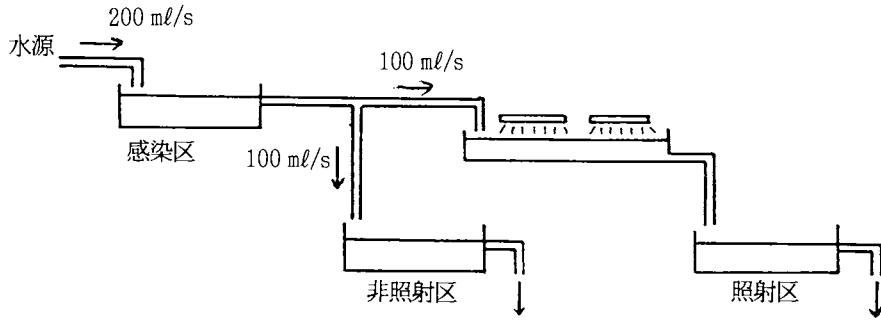


図2 人為的な IHN 発病用水の実験における実験区配列

結 果

各区の実験期間中における供試魚の累積斃死率を図3に示した。IHNを人為感染させた感染区では実験開始6日後からIHNの発病が始まり、累積斃死率は97.6%となった。又、感染区の排水がそのまま流入する非照射区では実験開始8日後からIHNが発病し、累積斃死率は100%に達した。両区の死魚は、筋肉内の線状出血、鰓の極度な貧血、腹部膨満のIHNの症状を示し、RTG-2細胞を用いてのウイルス検査の結果IHNVが分離された。

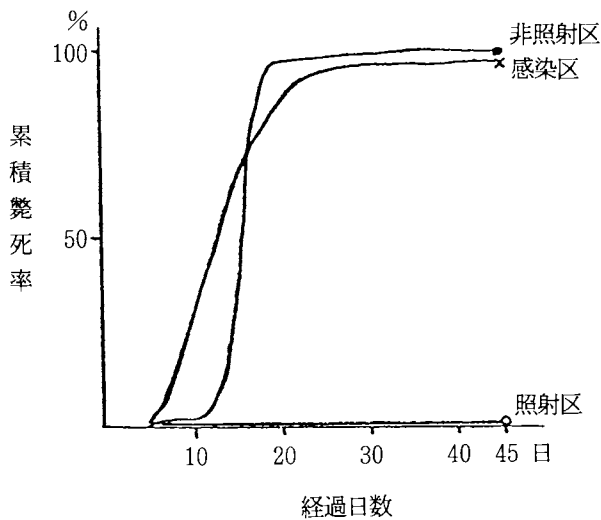


図3 人為的な IHNV 発病用水の実験における飼育中の累積斃死率

以上の両区に対して、感染区の排水を紫外線照射した照射区では、IHNの発生は認められず累積斃死率は1.2%にとどまり、その死魚はやせたものが多く、IHN症状は示さず、ウイルス検査の結果でもウイルスは分離されなかった。

なお、この実験で用いた紫外線照射装置の殺菌効果を調べた結果は表4に示したとおり、*A. salmonicida* に対しては流量 300 ml/s まで 100% 殺菌された。

表4 人為的なIHN発病用水の実験で用いた紫外線照射装置の殺菌効果

流量 (ml/s)	<i>A. salmonicida</i>		一般水中細菌	
	照射後菌数(1ml中)	殺菌率 (%)	照射後菌数(1ml中)	殺菌率 (%)
50	0	100	0	100
100	0	100	5	99.8
150	0	100	13	99.48
200	0	100	53	97.88
300	0	100	82	96.72
照射前	6.6×10^4		2.5×10^3	

実験4. 一般養鱒用水に対する紫外線照射 (1)

材 料 と 方 法

紫外線照射装置 実験2のAと同じ装置であるが、殺菌灯は2灯使用した。この装置に実験2と同様に当場の一般養鱒用水を1,000 ml/s流し紫外線照射を行った。

供試魚および実験区 供試魚は平均体重0.12gのニジマスの浮上期の稚魚で、1区10,000尾を用いた。供試までは内照式の紫外線流水殺菌器(セン特殊光源KKサニトロン)で処理した当場用水でふ化を行った。

実験区は、紫外線照射した用水による飼育群を照射区、無照射の用水による飼育群を非照射区とした。飼育水槽は360ℓの塩ビ水槽で消毒済みのものを用いた。給餌は1日3~4回行い、飼育管理にあたっては外部からの病原体汚染のないように注意した。

実験期間は49日間で、この間の飼育水温は10.1~13.4℃であった。

結 果

実験期間中の各区の累積斃死率を図4に示した。一般養鱒用水を紫外線照射した照射区では実験開始約30日後から斃死が始まり、約10日間で100%に近い斃死率となった。この斃死魚の症状は、体型的には良好であるが、腹部膨満、鰓の貧血が認められ、RTG-2およびFHM細胞を用いてのウイルス検査の結果ではIPNウイルスが分離されたことから、病名はIPNと診断した。

一方、一般養鱒用水を無処理で用いた非照射区では、実験開始4日後から鰓のキロドネラ症が発生し、8日間で100%に近い斃死率となった。

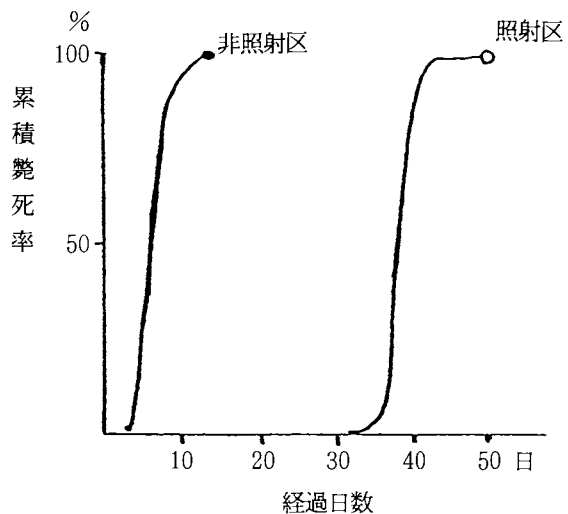


図4 一般養鱒用水に対する紫外線照射 (1) における累積斃死率

実験5 一般養鱒用水に対する紫外線照射 (2)

材 料 と 方 法

紫外線照射装置 実験2のCと同じ装置であり、殺菌灯は5灯使用した。この装置に実験2と同様に当場の一般養鱒用水を最高5,000 ml/s 流し紫外線照射を行った。

供試魚および実験区 供試卵はニジマス発眼卵 (平均卵重89mg) で、1区11,000粒を用いた。卵は供試前にPVPヨード剤 (明治製菓 商品名イソジン) 500 ppm 15分間の消毒を行った。

実験区は実験4と同様に照射区と非照射区を設定した。各区とも10,000粒(A群)、1,000粒(B群)の2群の卵をたて型ふ化槽に收容してふ化を行い、浮上後はA群を210ℓ、B群を45ℓの塩ビ製飼育水槽に移して飼育を行った。実験期間は97日間で、供試卵は15日目にふ化し、40日目に浮上した。給餌、飼育管理は実験4と同様に行った。飼育水温は5.2～12.8℃であった。

結 果

実験期間中の各区の累積斃死率を図5に示した。一般養鱒用水を紫外線照射した照射区では実験開始約75日後から体表、鰓のキロドネラ症、トリコディナ症が発生し、累積斃死率はA群16.7%、B群5.7%となった。しかし、その寄生虫症の発生までは餌付不良によるやせた死魚が多く、斃死率は3%程度であった。RTG-2細胞を用いた死魚のウイルス検査では、寄生虫症および餌付不良魚ともにウイルスは検出されなかった。

非照射区では、浮上前から死魚が現れ始め、死魚数はA群が65～80日目、B群が50～60日目に最大となり、累積斃死率はA群94%、B群87%となった。死魚のほとんどは筋肉内の線状出血、鰓の極度の貧血、腹部膨満、腎臓の褪色などのIHNの症状を示し、RTG-2細胞を用いたウイルス検査の結果では死魚からIHNVが検出された。

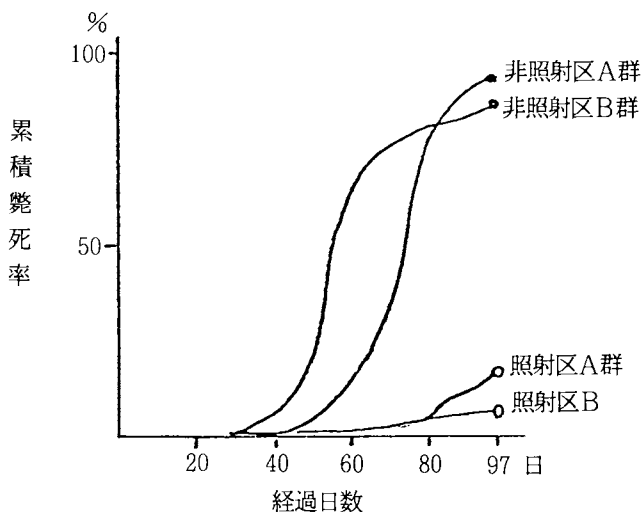


図5 一般養鱒用水に対する紫外線照射 (2) における累積斃死率

考 察

本研究では水面上から紫外線照射したいわゆる外照式の照射装置を用いて、用水の殺菌効果を検討した。まず、*A. salmonicida* に対する殺菌効果を検討した結果、15Wの殺菌灯1本の照射により、止水状態の菌数 10^5 /mlの水6ℓに対して10秒間照射で、また流水状態の菌数 $10^3 \sim 10^4$ /mlの水は流量5,000 ml/秒までそれぞれ100%殺菌できることが判明した。

これらの結果を基本にして、紫外線照射処理した用水を用いてニジマス稚魚の飼育実験を3回行ったが、その結果を表5にまとめた。実験3及び5では、IHNが紫外線照射区で発生しなかったのに

対し、非照射区では発生し、紫外線照射により IHN 予防効果のあることが認められた。しかし、IPN, トリコディナ症, キロドネラ症については照射区でも発生し、病原体により照射効果に差がみられた。

表5 紫外線照射した用水でニジマスのふ化および飼育をしたときの発病状況

実験番号	15 W 殺菌灯 1本当り流量 (ml/秒)	供試魚卵	発生した疾病	
			照射区	非照射区
実験3	50	ニジマス浮上稚魚 1区当り500尾	なし	IHN
実験4	500	ニジマス浮上稚魚 1区当り10,000尾	IPN	キロドネラ症
実験5	1,000	ニジマス発眼卵 1区当り10,000粒 と1,000粒	キロドネラ症 トリコディナ症	IHN

本報で関係のある各病原体の紫外線感受性は、これまでに、*A. salmonicida* について木村ら (1980 a) は99.9%以上殺菌する線量が $4 \times 10^3 \mu\text{ws}/\text{cm}^2$, IPNV及びIHNVについて吉水ら (1986) は99%以上感染価を減少させる線量が $1.0 \sim 1.5 \times 10^5 \mu\text{ws}/\text{cm}^2$ 及び $1.0 \sim 3.0 \times 10^3 \mu\text{ws}/\text{cm}^2$, *Trichodina nigra* 及び *Chilodonella cyprini* についてVLASENKO (1969) は致死量が $2.2 \times 10^5 \mu\text{ws}/\text{cm}^2$ 及び $1.0 \times 10^6 \mu\text{ws}/\text{cm}^2$ とそれぞれ報告している。これらの紫外線感受性を比較するとIHNVが*A. salmonicida* とともに高い感受性を示している。本研究の飼育実験でIHNVに対して予防効果の認められたのはIHNVの紫外線感受性が他の病原体と比べ高いことによるとみられ、15Wの殺菌灯1本の照射により流量1,000 ml/秒までは、水中のIHNVが供試魚に対して感染発病させる量以下にまで不活化されたものとみられる。その他のIPNやキロドネラ症の予防にはより高い紫外線照射量が必要であろう。

なお、本実験で使用した飼育用水は、一般の養鱒用水であり、懸濁物質量は測定しなかったが、通常の養魚排水程度含まれており、BULLOCK and STUCKEY (1977) は孔径25nmで濾過することにより殺菌効果の向上を報告しており、光の透過率をより高くすることを検討すれば殺菌効率をさらに上げることができよう。

次に、実際に事業場への応用を考えると、次のような養鱒場が最も適していると考えられる。即ち、水質的には良好な湧水等の水源を有しているながら、養成池や親魚池が隣接するためIHNV汚染があって、この水源を稚魚生産に使えないでいる養鱒場である。このような養鱒場では、IHNVが紫外線感受性の高いウイルスであることから、紫外線照射によりIHNVを発生させないで水源用水を使用できるものと考えられる。但し、ふ化施設や飼育池が他から汚染されないように防疫措置をとらねばならないことは当然であり、一般的には、当該施設はハウスなどで覆い隔離することが必要となろう。

このようにして紫外線照射により稚魚の自家生産を行うことができた場合、従来の他から種苗導入する方法と比べると、懸念される病原体侵入、導入時の輸送と環境変化によるストレスの発生といった問題が除かれる効果を持つと考えられる。

照射装置として、外照式のもの水面反射等の影響で内照式より殺菌効率は落ちるが、構造的に簡単で、用水も自然流下式でよいことから養鱒場において使用し易いものと思われる。但し、殺菌灯は寿命が4,000時間であり、紫外線出力はガラスの劣化等により時間経過とともに低下し、また周囲温度に影響され、20℃近辺の最高出力と比べ5℃では約20%出力が低下する(東芝電材(株)1979)という特徴があるので、実際の使用にあたっては注意を要する。特にマス類のふ化は冬期に行われること

が多いので、低い気温では出力低下を考慮し、殺菌灯の使用本数を増やすか、水量を減じることが必要である。

本実験の供試紫外線照射装置は、流水路の材質が木材および硬質塩化ビニールであり、木材の場合はアルミ箔を張る工夫をしたが、今後は水面の乱反射を最少限にする、流水路からの紫外線反射率を高める等の改良がさらに必要と考えられる。

要 約

1. 水面上から照射を行ういわゆる外照式の紫外線照射装置を用いて、水中の魚病細菌等の殺菌効果及びその照射処理した用水を用いた魚病予防効果を検討した。
2. 15Wの殺菌灯1本の照射により *Aeromonas salmonicida* に対して、菌数 10^6 /ml を含む止水6ℓは10秒間の照射、また菌数 $10^3 \sim 10^4$ /ml を含む流水は流量 5,000 ml/秒まで 100%の殺菌ができた。
3. ウイルス等で汚染された養鱒用水の流量 500 ml/秒及び 1,000 ml/秒に対し 15 Wの殺菌灯1本の照射を行い、この用水でニジマス卵のふ化及び稚魚飼育を行ったとき、IHNの発生を防ぐことができた。しかし、IPN、キロドネラ症、トリコディナ症は発生を防ぐことができなかった。
4. 外照式の照射装置は構造が簡単であり、養鱒場における種苗生産においてIHNの発生防止に有効と考えられる。

文 献

- BULLOCK, G. L. and H. M. STUCKEY (1977) : Ultraviolet treatment of water for destruction of five gram negative bacteria pathogenic to fishes. J. Fish. Res. Board Can. 8, 34, 1244 - 1249.
- 花田 博 (1975) : 流水殺菌装置の利用について。昭和49年度静岡県富士養鱒場事報, 54-56.
- 家坂剛正・岡崎 稔 (1970) : ニジマスのすい臓壊死症に関する研究-VI. 殺菌灯による予防効果並びに病原材料の接種による感受性。岐阜水試研報, No.15, 86-88.
- 木村喬久・吉水 守・阿刀田光紹 (1980 a) : 養魚用水の紫外線殺菌について-III. U, V. 処理水使用によるサケ・マス孵化成績について。魚病研究, 14, 139 - 142.
- 木村喬久・吉水 守・田島研一・絵面良男 (1980 b) : 養魚用水の紫外線殺菌について-II. 魚病原因ミズカビの紫外線感受性について。魚病研究, 14, 133 - 137.
- 長野県水産試験場 (1989) : 長野県内マス類の種苗生産ならびに需給実態調査。昭和62年度長野県水産試験場事業報告, 39-41.
- 東京都水産試験場 (1976) : 紫外線で殺菌した飼育水によるニジマス稚魚の飼育試験。昭和50年度指定調査研究総合助成事業「病害研究」報告書, 11-13.
- 東芝電材㈱ (1979) : 紫外線による水の殺菌。東芝電材㈱設計技術資料 No.E 2-2-5 B, 23 P.
- 牛山宗弘・渡辺佳一郎・植松久男 (1973) : 殺菌灯効果試験。昭和47年度静岡県富士養鱒場事報, 54-56.
- VLASENKO, M. I. (1969) : Ultraviolet rays as a method for the control of fish eggs and young fishes. Problems of Ichtyol., 9, 697-705.
- 吉水 守・瀧澤宏子・木村喬久 (1986) : 魚類病原ウイルスの紫外線感受性。魚病研究, 21, 47-52.