

# 淡水魚病原細菌 4 種に 対する銀イオンの抗菌 効果

中津川 俊 雄  
山 田 茂\*

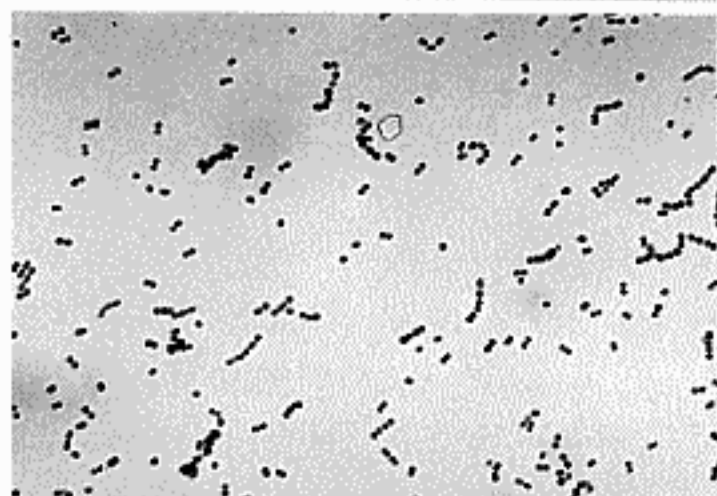
我が国の内水面養殖業の対象魚種の中で重要なアマゴ、ニジマスおよびアユに対する4種の代表的な魚病細菌を取り上げ、銀イオンの抗菌性を検討した。その結果、供試した銀イオン担持無機系抗菌剤である銀メッキ繊維を浸漬した銀イオン水（銀イオン 0.94 mg/l あるいは 0.41 mg/l）では、せっそう病、連鎖球菌症および冷水病原因菌はいずれも4時間後には生菌数が  $10^2$  CFU/ml 未満となり、細菌性出血性腹水病（アユのシュードモナス病）原因菌でも24時間後には  $10^1$  CFU/ml 未満となった。したがって、銀イオンはこれらの魚病細菌に対し抗菌効果があると判断された。

人間の生活環境中における有害微生物の制御、抑制の技術は近年急速に進歩し、種々の材料が抗菌剤として商品化され利用されている。細菌の発育を阻止する抗菌という語句が一般化して、我が国では抗菌グッズという商品が流行している。抗菌剤には有機系抗菌剤と無機系抗菌剤が含まれるが、抗菌の主役は無機系抗菌剤である（西野ら、1996）。西野ら（1996）によれば、無機系抗菌剤の抗菌成分は金属であり、特に抗菌効果が高くかつ安全性が高い銀が中心的成分とされる。一般に広く用いられている銀イオン担持無機系抗菌剤には溶出型と非溶出型があり、抗菌機構が異なると考えられている（大谷、1997）。

水産養殖業界では、細菌やウイルス等の有害微生物の蔓延による各種流行病の発生により毎年大きな被害が出ている。海産魚の養殖や種苗生産ではマダイイリドウイルス病やウイルス性神経壊死症といったウイルス病が最近問題となっている。一方、内水面養殖では、サケ・マス類のせっそう病や連鎖球菌症、アユの冷水病や細菌性出血性腹水病等、細菌性疾病が大きな問題となっている。そこで、淡水魚の病原細菌として知られる4種の細菌に対する、溶出型銀イオン担持無機系抗菌剤としての銀メッキ繊維による抗菌効果を調べた。その結果、供試した魚病原因細菌に対する銀イオンの抗菌作用が認められたので報告する。

## 材料および方法

供試魚病原因細菌 病原細菌としては、せっそう病罹病アマゴの腎臓から分離された定型 *Aeromonas salmonicida* OK-9608 株、連鎖球菌症罹病ニジマスの腎臓から分離された *Streptococcus iniae* ( $\beta$  溶血性連鎖球菌) OK-9723 株、細菌性出血性腹水病（シュードモナス病）罹病アユの腎臓



\* 大野商事株式会社 (Ohno Company Limt., Takadai Nagaokakyo 617-0847, Japan)

Table 1. Viable cell counts of 4 bacterial pathogens of freshwater fish in ionized silver water (Ag water) and sterile PBS (-) at 4 and 24 hours after exposure.

Strain* <sup>1</sup>	Viable cell count at start	Viable cell count	
		4 hours	24 hours
As (OK-9608)	Ag water* <sup>2</sup>	$1.6 \times 10^7$	$< 1 \times 10^2$
	PBS (-)		$8.6 \times 10^5$
Si (OK-9723)	Ag water* <sup>2</sup>	$6.3 \times 10^5$	$< 1 \times 10^2$
	PBS (-)		$5.4 \times 10^5$
Pp (AK-9901)	Ag water* <sup>3</sup>	$3.4 \times 10^7$	$1.8 \times 10^3$
	PBS (-)		$3.0 \times 10^7$
Fp (AK-9903)	Ag water* <sup>3</sup>	$3.3 \times 10^6$	$< 1 \times 10^1$
	PBS (-)		$4.7 \times 10^4$

\*<sup>1</sup> As: *Aeromonas salmonicida*, Si: *Streptococcus iniae*, Pp: *Pseudomonas plecoglossicida*, Fp: *Flavobacterium psychrophilum*. \*<sup>2</sup> Ag water was contained 0.94 mg/l of ionized silver.

\*<sup>3</sup> Ag water was contained 0.41 mg/l of ionized silver.

から分離された *Pseudomonas plecoglossicida* AK-9901 株および冷水病罹病アユの鰓から分離された *Flavobacterium psychrophilum* AK-9903 株を供試した (Table 1)。

なお、OK-9608 株にはせつそう病診断用抗血清 (抗 *A. salmonicida* 家兔血清, 動生協作製), OK-9723 株には  $\beta$  溶血性連鎖球菌診断用抗血清 (抗 *Streptococcus* sp. 家兔血清, 同), AK-9901 株にはシュードモナス抗血清 (中津川・飯田, 1996) および AK-9903 株には抗冷水病診断用抗血清 (抗 *F. psychrophilum* 家兔血清, 東京大作製) をそれぞれ用いたスライド凝集反応あるいは間接蛍光抗体法により, それぞれ *A. salmonicida*, *S. iniae*, *P. plecoglossicida* および *F. psychrophilum* に同定されることを確認した。以下便宜上それぞれ As 株, Si 株, Pp 株および Fp 株と略す。

**菌液の調製** As 株および Si 株は, ブレインハートインフュージョン寒天培地 (BHI 寒天培地, Oxoid) で 18°C, 4 日間前培養を行い, 菌をかきとって滅菌磷酸緩衝溶液 (ダルベッコ PBS (-), 日水: 以下 PBS (-) と略記) に懸濁させ, 供試菌液とした。供試菌液中の生菌数は As 株では  $1.6 \times 10^9$  CFU/ml であり, Si 株では  $6.3 \times 10^7$  CFU/ml であった。

Pp 株はトリプチケースソイ寒天培地 (TSA 培地, BBL) で 18°C, 4 日間前培養を行い, Fp 株は改変サイトファーガ寒天培地で同様に前培養を行い, 得られた菌を滅菌 PBS (-) に懸濁させ, 供試菌液とした。菌液中の生菌数は, Pp 株では  $3.4 \times 10^9$  CFU/ml であり, Fp 株では  $3.3 \times 10^8$  CFU/ml であった。

**供試銀イオン水** As 株および Si 株には, 綿状にした銀メッキ繊維 (X-static, Sauquoit) 5 g を滅菌 PBS (-) 1 l

に夏季に室温で 5 日間浸漬して銀イオンを溶出させ, 0.22  $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過した銀イオン水を供した。Pp 株および Fp 株に供した銀イオン水は, 同じく銀メッキ繊維 7 g を滅菌 PBS (-) 500 ml に冬季に室温で 7 日間浸漬して銀イオンを溶出させ, 0.45  $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過した。供試銀イオン水中の銀イオン濃度は, 前者では 0.94 mg/l であり, 後者では 0.41 mg/l であった。

**抗菌効果の判定** 供試銀イオン水 10 ml に供試菌液をそれぞれ 0.1 ml 接種して 18°C で培養した。滅菌 PBS (-) 10 ml に同様に供試菌液を 0.1 ml 接種し, 陰性対照とした。供試銀イオン水中および陰性対照の滅菌 PBS (-) 中の 4 時間後および 24 時間後の生菌数を 10 倍階段希釈・培養法で求めて, 抗菌効果を判定した。生菌数測定にはそれぞれの菌の前培養に用いた培地と培養温度を用いた。

## 結果および考察

供試銀イオン水中および滅菌 PBS (-) 中の 4 時間後および 24 時間後の生菌数を Table 1 に示した。

As 株の供試銀イオン水中における生菌数は, 試験開始時には  $1.6 \times 10^7$  CFU/ml であったが, 4 時間後には  $1 \times 10^2$  CFU/ml 未満となり, 24 時間後には  $1 \times 10^1$  CFU/ml 未満 (検出限界) となった。

Si 株の銀イオン水中の生菌数は, 試験開始時の  $6.3 \times 10^5$  CFU/ml から 4 時間後には  $< 1 \times 10^2$  CFU/ml, 24 時間後には  $< 1 \times 10^1$  CFU/ml となった。

Pp 株の銀イオン水中の生菌数は, 試験開始時の  $3.4 \times$

$10^7$  CFU/ml から4時間後には  $1.8 \times 10^3$  CFU/ml となり、24時間後には  $< 1 \times 10^1$  CFU/ml となった。

Fp 株の銀イオン水中の生菌数は、試験開始時の  $3.3 \times 10^6$  CFU/ml が4時間後および24時間後とも  $< 1 \times 10^1$  CFU/ml となった。

一方、滅菌 PBS 中では Fp 株が顕著な減少を示し、これは PBS 中に含まれる0.8%の塩化ナトリウム濃度の影響によるものと推測された。しかし、銀イオン水中での減少傾向は更に顕著で両者には明らかに差がみられた。他の3菌種では PBS 中でほとんど減少しないか、わずかに減少したのみで、銀イオン水中との差は明らかであった。

以上のように、サケ・マス類のせっそう病原菌である As 株、連鎖球菌症原因菌である Si 株およびアユの冷水病原菌である Fp 株では生菌数が4時間後に  $10^2$  CFU/ml 未満になっており、これらの魚病細菌に対する銀イオン水の抗菌効果はあると判断された。また、アユのシュードモナス病原菌 Pp 株においては、生菌数が4時間後には約 1/10,000 となり、24時間後には10未満になっており、やはり抗菌効果はあるものと判断された。

実際のサケ・マス類やアユの養殖場で、これら魚病細菌に対する銀イオン水の抗菌効果を応用する場合、飼育用水からの感染が疑われる場合に限られるであろう。常時飼育

用水中に有効な銀イオン濃度を維持できれば、実用化の可能性はある。また、循環水を使用する活魚運搬車等への応用も可能と考えられる。今回の試験では試験開始時の銀イオン濃度のみを計測し、銀イオン水中の経時的な濃度変化は調べていない。今後、銀メッキ繊維からの銀イオンの溶出条件を検討する必要がある。

西野ら (1996) は、銀イオンの短所として3つを挙げている。第一にイオン性の銀化合物では光に弱く、光エネルギーを受けると銀コロイドになり、抗菌性を失う。第二に塩素等のハロゲンと極めて結合親和性が高く、ハロゲン化銀を形成することで、抗菌性を失うのである。第三は熱に弱いことである。実用化には、更にこれらの問題を解決する必要がある。

## 文 献

- 中津川俊雄・飯田悦左. 1996. アユ病魚から分離された *Pseudomonas* sp.. 魚病研究, 31: 221-227.
- 西野 敦・富岡敏一・富田勝己・小林 晋. 1996. 抗菌剤の科学: 工業調査会, 東京, 148 p.
- 大谷朝男. 1997. 抗菌剤とその分類—無機系抗菌剤, 「抗菌のすべて, 弓削治・横山浩・坂上吉一編著, 繊維社, 大阪」, 129-134.

## Synopsis

### Antibacterial Activity of Ionized Silver to Four Bacterial Pathogens of Freshwater Fish

Toshio NAKATSUGAWA and Shigeru YAMADA

Four bacterial diseases, furunculosis, streptococcosis, cold-water disease and bacterial hemorrhagic ascites mainly caused mass mortalities among pond-cultured freshwater fish. The antibacterial activity of ionized silver water (Ag water) to these bacterial pathogens was investigated by using silver plating fiber cotton (X-static, Sauquoit).

Ag water were prepared as follows;

I. 5 g of silver cotton were immersed in 1 l of sterile PBS (-) for 5 days. 0.22  $\mu$ m filtered PBS (-) were contained 0.94 mg/l of ionized silver.

II. 7 g of cotton were immersed in 500 ml of PBS (-) for 7 days. 0.45  $\mu$ m filtered PBS (-) were contained 0.41 mg/l of ionized silver.

Cultured four bacteria, *Aeromonas salmonicida* (As), *Streptococcus iniae* (Si), *Flavobacterium psychrophilum* (Fp) and *Pseudomonas plecoglossicida* (Pp) were suspended with sterile PBS (-). 0.1 ml of suspended PBS was added into 10 ml of Ag water and cultured at 18°C. Viable cell counts were made at 4 and 24 hours after exposure. As (in Ag water I), Si (in Ag water I) and Fp (in Ag water II) were counted  $< 10^2$  CFU/ml at 4 hours. Pp (in Ag water II) was  $< 10^1$  CFU/ml at 24 hours. These results indicated ionized silver possessed the antibacterial activity to four bacterial pathogens.