

河川における冷水病菌の動態

冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流事例

原 徹, 桑田知宣, 斉藤 薫

The movement of cold-water disease in river
Instance of stocking of ayu not infected with cold-water disease

TORU HARA, TOMONORI KUWADA AND KAORU SAITOU

近年アユ (*Plecoglossus altivelis*) 漁業の不振が続く、漁獲量は1992年の1,719t¹⁾をピークに減少し、2003年には522t²⁾まで落ち込んでいる。アユ漁業不振の要因の一つとして、冷水病の河川での蔓延による影響がある。アユの冷水病は *Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌感染症で、1987年に徳島県の養殖場のアユ種苗において初めて確認された。³⁾ その後、全国各地で発生が見られるようになり、養殖場のみならず河川にも蔓延し、アユ漁業の不振の一要因となっている。⁴⁾ 岐阜県では1994年に初めて確認され (未発表)、以後県内の多くの河川で毎年発生している。これに伴い遊漁者も減少し、アユの遊漁証の販売枚数も、年券は1992年の51,106枚をピークに、2002年には28,505枚に、日券は1994年に137,070枚であったのが、2002年には69,089枚にそれぞれ減少し、⁵⁾ 漁業協同組合運営および地域経済にも打撃を与えている。

河川における冷水病の蔓延には、冷水病に罹った種苗の放流が大きな原因となっていると考えられており、⁶⁾ 冷水病菌を保菌していない種苗の放流により高い放流効果が得られた報告もある。⁷⁾ 一方で、付着藻類や河水からも冷水病菌が検出され、冷水病菌が、冬期にも存在している可能性が示唆されている。⁸⁾ しかし、河川における疫学的調査が不十分なため、その感染環 (動態) が明らかになっていない。

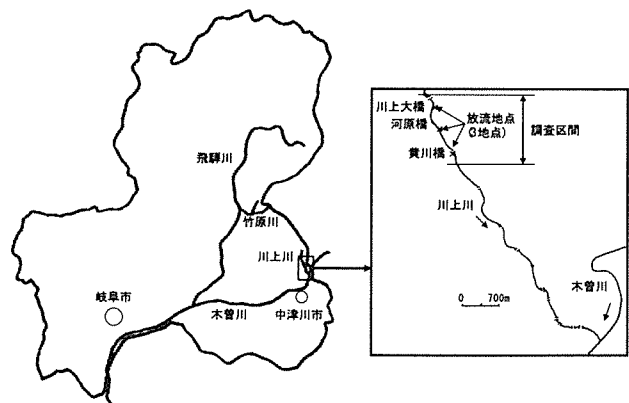
本研究では、冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流により、友釣り解禁日までの冷水病発症の抑制を検討するとともに、おとりアユを介した冷水病菌の持ち込みと、冷水病の発症の因果関係を解明することを目的として研究を行った。

方 法

調査河川と放流種苗

木曾川支流の川上川において調査を行った (第1図)。調査区間の流程は1,480mで平均川幅は9.2mである。2005年の友釣り解禁日は、7月10日であった。

2005年5月10日に長野県水産試験場諏訪支場で生産された人工産アユに脂鱗を切除標識した。5月11日に放流種苗の冷水病の保菌率を調べるため30尾を保菌検査に供試し、7,348尾 (平均体重7.0g) を調査区間の3地点に放流した。調査区間の放流密度は0.54尾/m²であった。



第1図 調査区間概況図

放流日から友釣り解禁日までの間は潜水目視調査で一視野当たりのナワバリ個体数と群れアユ個体数を計数するとともに、体表に症状(体側の発赤や穴あき症状)のある個体の確認を行った。また、電気ショッカーで標識魚を再捕して、研究所に持ち帰り冷水病菌の保菌検査を行った。また、友釣り解禁後には友釣りによりアユを再捕して冷水病菌の保菌検査を行うとともに、友釣りで使用したおとりアユにいても保菌検査を行った。

河川環境中における冷水病菌の有無を調べるため、付着藻類からの冷水病菌の検出についても検証した。

冷水病菌の同定

再捕したアユおよび付着藻類について、冷水病菌の保菌の有無を培養法およびPCR法⁹⁾により確かめた。アユについては、鰓および腎臓から滅菌綿棒を用いて釣菌し、改変サイトファーガ寒天培地¹⁰⁾に塗抹、4℃で培養した。付着藻類については、藻類が繁茂している粒径5~10mmの小石を採集して、培地上で直接転がして塗抹し、4℃で培養した。培養後、発現した黄色コロニーからDNAを熱抽出した。抽出したDNAを、プライマーPSY-G1¹¹⁾を用いて、変成が94℃15秒、アニーリングが56.0℃20秒、伸長が72℃60秒で35サイクルの反応条件でPCRを行った。PCR反応液を試料として、1.1%アガロースゲルを用い、定電圧100V、17分の条件で電気泳動を行い、目標断片の有無を確認した。断片が確認されたDNAについては、プライマー*fpPPIC1*¹²⁾を用いて、さらに変成が95℃15秒、アニーリングが60.0℃30秒、伸長が72℃30秒で35サイクルの反応条件でPCRを行った。PCR反応液を試料として、1.1%アガロースゲルを用い、定電圧100V、17分の条件で電気泳動を行い、目標断片が確認された場合、本研究では陽性検体とした。

また、この陽性検体の遺伝子型の判別を、*fpPPIC1*のPCR増幅産物を用いてPCR-RFLP法¹³⁾により行った。*fpPPIC1*のPCR増幅産物を試料として、制限酵素Hinf-Iで37℃で2時間消化したものを3.0%アガロースゲルで定電圧100V、

30分の条件で電気泳動を行い、遺伝子型を判別した。遺伝子型A型は、154bp、129bp、63bpの3つの断片に、遺伝子型B型は、192bp、154bpの2つの断片になるとされているため、¹³⁾ 192bp、154bp、129bp、63bpの4つの断片がみられたものを遺伝子型A+B型と判定した。

結果

放流種苗の保菌結果(放流前)

放流前にサンプリングした標識放流魚30尾から冷水病菌の分離を試みたが、鰓と腎臓ともに分離されなかった(第1表)。

放流後の潜水目視調査結果

潜水目視調査は調査区間およびその下流で、5月25日、6月9日、22日の3回行った。全ての調査日において、冷水病の症状が認められた個体は確認されなかった。また、潜水目視調査の際に調査区間内における一目視野当たりのナワバリアユおよび群れアユの平均確認尾数を第2表に示した。放流から日数が経過するにつれ、群れアユに対するナワバリアユの個体数が増えてナワバリ形成率が上昇し、群れアユの個体数が減少する傾向がみられた。

放流種苗の保菌結果(放流後)

友釣り解禁以前には、5月25日再捕魚の鰓から遺伝子型B型の冷水病菌が検出(1/30)されが、6月9日および22日の再捕魚からは、ともに冷水病菌は検出されなかった(第1表)。

友釣り解禁後には、解禁前と比較してより多くの検体で冷水病菌が確認された。鰓での冷水病菌の分離率は、友釣り解禁日(7月10日)は、83.1%(58/77)、21日が93.5%(41/46)、8月11日が83.8%(31/37)といずれも高い値で推移した。腎臓での冷水病菌の分離率は、友釣り解禁日(7月10日)が24.7%(19/77)、21日が47.8%(22/46)と上昇したが、8月11日には5.4%(2/37)と低い値となった(第1表)。陽性検体の遺伝子型は、友釣り解禁日(7月10日)再

第1表 放流種苗および河川再捕魚の保菌検査結果

検 体	検体数	PCR法(陽性数/検体数)		遺伝子型			
		鰓	腎臓	鰓		腎臓	
				A	B	A	B
放流種苗	30	0/30	0/30				
5月25日電気ショッカー再捕魚	30	1/30	0/30		1		
6月9日電気ショッカー再捕魚	30	0/30	0/30				
6月22日電気ショッカー再捕魚	30	0/30	0/30				
7月10日友釣り再捕魚	77	58/77	19/77	55	3	18	1
7月21日友釣り再捕魚	46	41/46	22/46	41		22	
8月11日友釣り再捕魚	37	31/37	2/37	31		2	

第2表 潜水目視における一視野当たりの平均確認個体数

調査日	目視数	ナワバリアユ(尾)	群れアユ(尾)	ナワバリ形成率(%)
5月25日	24	0.5	43.0	1.15
6月9日	62	2.3	19.3	10.55
6月22日	62	3.6	15.8	18.39

第3表 おとりアユの保菌検査結果

検体日	検体数	PCR法 (陽性数/検体数)		遺伝子型			
		鰓	腎臓	鰓		腎臓	
				A	B	A+B	A
7月10日	12	12/12	7/12	12		7	
7月21日	12	12/12	2/12	8		1	
8月11日	9	9/9	5/9	3		6	

第4表 付着藻類からの冷水病菌検出結果

採集日	PCR法 (陽性数/検体数)	遺伝子型	
		A	B
5月6日	2/10	2	
5月25日	0/10		
11月17日	1/10	1	

捕魚の鰓から分離された3検体、腎臓から分離された1検体がB型であった以外は、鰓から分離された127検体、腎臓から分離された42検体がA型であった。

再捕魚の漁獲状況と外観症状

各調査日のCPUE(尾/時間/人)は、友釣り解禁日(7月10日)が2.33、21日が1.53、8月11日が2.85であった。

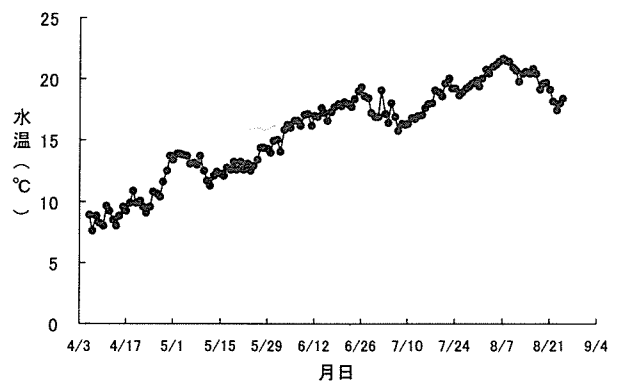
再捕魚の外観症状は、友釣り解禁日(7月10日)には下顎や鰭基部の発赤が認められたが、体側の穴あき症状は認められなかった。21日(解禁後11日目)には下顎や鰭基部の発赤に加え、穴あき症状が認められる個体が見られた。28日(解禁後18日目)に潜水目視調査を行ったところ、穴あき症状がある個体が、流れの緩やかな場所等に群れているのが多く確認された。8月11日(解禁後32日目)には穴あき症状が治癒過程にあるものや治癒したものが見られた。この間の河川水温の日平均は20℃以上で推移していた(第2図)。

おとりアユの保菌結果

友釣りで使用したおとりアユの保菌検査結果および陽性検体の遺伝子型を第3表に示した。友釣り解禁日(7月10日)の12尾の保菌率は鰓で12/12、腎臓で7/12、21日の12尾が鰓で12/12、腎臓で2/12、8月11日の9尾が鰓で9/9、腎臓で5/9であった。陽性検体の遺伝子型は、21日の鰓1検体と8月11日の鰓6検体でA型とB型が確認された以外は全てA型であった。

環境中の冷水病菌の有無とCPUE

川上川において小石に付着した藻類からの冷水病菌の



第2図 川上川平均水温の推移

検出結果を第4表に示した。アユ種苗放流開始以前の5月6日に冷水病菌が検出(2/10)されたが、網漁解禁後の8月30日には冷水病菌は検出されなかった。しかし、アユが河川にいなくなった11月17日には再び検出(1/10)された。遺伝子型は、5月6日、11月17日ともにB型であった。

考 察

川上川において、アユが放流される以前の5月6日とアユが河川にいなくなった後の11月17日にサンプリングした付着藻類から遺伝子型がB型の冷水病菌が検出された。この結果はアユが河川にいない時期にも、遺伝子型B型の冷水病菌が河川に存在していることを意味している。また冷水病菌を保菌していない種苗を河川に放流した2週間後の再捕魚からも遺伝子型B型の冷水病菌が検出されており、放流されたアユが河川に残留していた遺伝子型B型の冷水病菌に感染した可能性が示唆された。しかし、潜水目視調査で調査区間内およびその下流でも冷水病の症状が現れている個体は確認されず、聞き取り調査でも大量死は起こったという情報はなかった。さらに、6月に2回再捕した個体からも遺伝子型B型の冷水病菌の保菌が確認されなかったことから、河川に存在していたB型の冷水病菌はアユに感染するが、病原性は弱いと推察され、冷水病を保菌していないアユ種苗の放流により友釣り解禁日までの冷水病被害を抑制することが期待できると考えられた。

友釣り解禁日前の電気ショッカー再捕魚からは遺伝子型A型の冷水病菌は確認されていないが、友釣り解禁日の再捕魚からは遺伝子型A型の冷水病菌が確認されている。しかし、友釣り解禁日に販売されたおとりアユは遺伝子型A型の冷水病菌の保菌率が高かった。川上川の友釣り解禁日は付近の付知川の解禁日から1か月以上遅い

ため、付知川で漁獲されたアユがおとりアユとして友釣り解禁前に川上川流域で蓄養されていた可能性や調査区間から上流にはおとりアユ販売所はないためあらかじめ購入したおとりアユを蓄養していた可能性があり、その排水が河川に流入しているため、遺伝子型A型の冷水病菌が河川に持ち込まれ、放流した標識魚に感染し、友釣り解禁日の再捕魚から保菌が確認された可能性が考えられた。

CPUEの低下にともない、体側等に穴あき症状が認められる個体や、流れの緩やかな場所等に群れている状態が多く観察されたことから、友釣り解禁後に多くのおとりアユが河川に持ち込まれ、河川で遺伝子型A型の冷水病菌が蔓延してCPUEが低下したことが伺われた。しかし、河川水温が上昇すると体側等の穴あき症状の治癒途中や治癒した個体が再捕され、再捕魚の腎臓における分離率も低下したことから、遺伝子型A型の冷水病菌が感染しても全ての個体が死亡するわけではなく、死亡に至らなかった個体は河川水温が上昇して、日平均水温が20℃以上の日が10日以上続くと、穴あき症状が回復して再び釣れるようになることが推測された。

今後、河川に残留する冷水病菌の存在およびその遺伝子型と放流種苗への影響について、より詳細な調査をおこなう必要がある。また、おとりアユが遺伝子型A型の冷水病菌の河川への汚染源の一つになっている可能性が高いと考えられるため、今後冷水病菌を保菌していないおとりアユの生産と供給体制の整備についても検討する必要がある。

要 約

1. 木曾川支流の川上川に、冷水病菌を保菌していない長野県水産試験場諏訪支場産人工産アユを脂鰭を切除して標識放流し、冷水病発症状況を継続調査した。
2. 冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流により友釣り解禁日までの冷水病被害を抑制することが期待できると考えられた。
3. アユが河川にいない時期にも、遺伝子型B型の冷水病菌が河川に存在していることが明らかになったが、それが原因となる冷水病の蔓延は確認されなかった。
4. 友釣り解禁後に河川で蔓延したのは遺伝子型A型の冷水病菌で、それはおとりアユによる持ち込みの可能性が高いことが伺われた。
5. 遺伝子型A型の冷水病菌がアユに感染しても全ての個体が死亡するわけではなく、死亡に至らなかった個体

は河川水温が上昇して、日平均水温が20℃以上の日が10日以上、継続すると、穴あき症状が回復することが明らかになった。

6. 以上から、おとりアユの持ち込みが遺伝子型A型の冷水病菌の河川への汚染源の一つになっている可能性が高いと考えられる。おとりアユについて、冷水病菌を保菌していない魚の生産と供給体制の整備について検討する必要がある。

文 献

- 1) 農林水産省統計情報部. 内水面漁業漁獲量. 平成4年漁業・養殖業生産統計年報 1994;188-189.
- 2) 農林水産省統計情報部. 内水面漁業漁獲量. 平成15年漁業・養殖業生産統計年報 2005;164-165.
- 3) 井上 潔. アユの冷水病. 海洋と生物 2000;22:35-38.
- 4) 岐阜県農林水産局水産振興室. 遊漁状況, 岐阜県の水産業 2004;13-15.
- 5) 若林久嗣, 沢田建蔵, Bertolini JM, Rohovec JS. アユの冷水病について. 平成4年度日本魚病学会春季大会講演要旨集 1992;5.
- 6) 植木範行, 増成伸文. 一河川の発病経過から見たアユの冷水病の特性. 岡山水試報 2000;15:47-50.
- 7) 川之辺素一, 沢本良一, 山本 聡. 千曲川におけるアユの放流効果と冷水病の関係. 長野水試研報 2005;7:10-15.
- 8) 網田健次郎, 星野正邦, 本間智晴, 若林久嗣. 河川における *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. 魚病研究 2000;35(4):191-197.
- 9) Beverton RJH, Holt SJ. On the dynamics of exploited fish populations. *Fish. Invest.*, Ser. II 1957;19:533.
- 10) Izumi S, Wakabayashi H. Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from apparently healthy juvenile ayu and coho salmon eggs. *Fish Pathol.* 1997;32:169-173.
- 11) Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.* 2003;56:207-214.
- 12) 吉浦康寿, 釜石 隆, 中易千早, 乙竹 充. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的としたPCRによる *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究 2006;41(2):67-71.