

健全な内水面生態系復元等推進委託事業

- 放流効果および漁業実態調査 -

湯浅明彦・竹内 章

目的

調査対象河川の海部川では、例年アユ漁解禁後にアユに冷水病が発病する。平成17年の調査結果では、冷水病の主要な感染源は釣人と釣人が持ち込むおとりアユと考えられたが、アユ漁解禁前の河床の石の付着藻類から、冷水病原菌の特異な遺伝子が頻繁に検出された。

平成18年には、河床の石の付着藻類が、冷水病の感染源となる可能性を調査した。しかし、成熟したアユが冷水病を発病する11月から12月の産卵場周辺以外には、付着藻類から冷水病原菌の遺伝子を検出することはできなかった。限られた数の親アユから次の世代を育成することを長年つづけたアユ種苗（長期継代魚）は、冷水病に対する耐病性が低下していることが室内の攻撃試験により明らかになった。3年間の事業の最終年である平成19年の調査の目的を次の三点とした。

- 1.冷水病の感染防除策として、海部川周辺地域のおとりアユ販売店に、無病のアユ種苗を供給する方法を検討する。
- 2.徳島県栽培漁業センターで生産した継代数の異なるアユ種苗について、河川に放流した後の冷水病の発病と生き残りについて明らかにする。
- 3.河床の石の付着藻類から、冷水病原菌の遺伝子を検出する方法と、検出感度について検討する。

材料と方法

1 アユの漁獲と冷水病発病の実態調査

アユ資源の管理団体である海部川漁業協同組合から聞き取りを行った。漁場監視員に依頼して、遊漁者から聞き取った釣獲尾数や時間を漁場別に日誌に記帳してもらった。

2 おとりアユ販売店に対する無病アユ種苗の供給について

飼育している種苗の由来が明らかで保菌の可能性が少ないアユ養殖業者について飼育履歴を観察し、斃死がみられる場合には必要な検査を実施した。飼育中に冷水病の発病がなかった2業者におとりアユの販売を依頼した。調査河川でおとりアユを販売している4業者に、同アユ養殖業者から購入するように協力を依頼した。

3 皮下注射法による冷水病の攻撃試験と半数致死接種量（LD50）の測定

4段階の濃度に希釈した冷水病原菌液を試験魚の皮下に接種し、死亡率から半数致死摂取量を計算した。-80℃で凍結保存したPH0424株について筋肉内接種による魚体通過を2回実施し、分離した菌株を攻撃に用いた。菌株をMCY液体培地で吸光度0.40まで培養した後、菌体を遠心分離し、滅菌PBSで菌液を調整した。平均体重11.3gの長期継代魚（以下F17と略記する）、平均体重14.4gの短期継代魚（以下F2と略記する）、平均体重9.3gの海産稚魚各20尾を試験魚とし、各系統で試験区を4区設けた。FA100で麻酔した試験魚の背鰭基部の皮下に、皮下注射針を装着した分注器で菌液を30μLずつ接種した。対照区は20尾のF17に、菌液の作成に用いた滅菌PBSを接種した。一尾当たりの接種菌量は、多いものから107.6, 106.6, 105.6, 104.6CFUであった。飼育水を17~18℃に冷却して14日間飼育し、冷水病の発病による死亡魚を計数した。接種菌量ごとに、系統による死亡率についてフィッシャーの正確確率検定を行った。系統別のLD50をプロビット法で計算した。

4 F2とF17種苗の比較放流試験

天然アユの遡上がない海部川支流小川谷川の砂防堰堤上流に（図1）、脂鰭を切除したF2種苗を放流した（表1）。

表1 短期継代魚（F2）の標識放流の概要

放流日	放流場所	放流尾数	標識
H19.5.14	海部川支流小川谷、砂防堰堤上流4.0kmの区間	平均体重4.9g、約19.5千尾(96kg)	脂鰭の切除

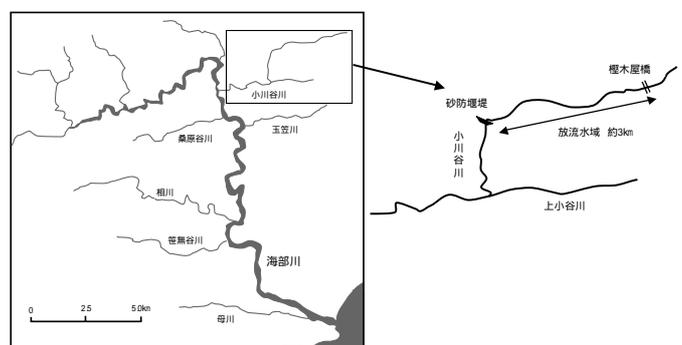


図1 放流水域の位置

同河川には平均体重4.5gのF17種苗約23千尾を、41日早い4月3日に標識を付けずに放流した。その後、5月24日から9月13日の間に9回採捕調査を実施した。再捕魚は標識の

有無を確認し、冷水病の症状の観察と保菌検査を実施した。

保菌検査はPCR法と培養法で実施した。PCR法では、濃縮した鰓の洗浄水と脾臓組織から抽出したDNAを検体に用いて、PPIC遺伝子を標的としたnestedPCR法により特異的な遺伝子配列の検出を行った。再捕したアユの鰓弁を切除し、マイクロチューブ内で滅菌水道水と共に充分攪拌した。この鰓洗浄水を遠心分離で20倍に濃縮し、5% Chelex 溶液に10 μ L添加することでDNAを抽出した。冷水病の症状が見られた8月9日から9月13日の再捕魚では、脾臓組織（腎臓組織で代替した場合があった）をSTE溶液で磨砕したのからDNAを抽出した。同時に、鰓と腎臓から白金耳で改変サイトファーガ寒天培地（鰓の場合は抗生物質のTobramycinを2.5ppm添加した）に塗抹して細菌分離を行った。更に、鰓濃縮液と脾臓磨砕液の陽性検体について、gyrB遺伝子を標的とするnestedPCR法により特異的な遺伝子配列の検出を行った。それぞれの増幅産物について、RFLP法により遺伝子型別を行った。また、改変サイトファーガ寒天培地に発育した黄色コロニーから熱抽出法でDNAを抽出し、同様にPCR-RFLP法による遺伝子型別を行った。コロニーからのDNAの抽出は、一検体あたり一株とした。

5 河床の石の付着藻類から、冷水病原菌を検出する方法と検出感度について

海部川の早瀬で採取した河床の石を、段階希釈で1mL当たり $10^{0.5}$ から $10^{5.4}$ CFUに濃度を調整した冷水病菌液に30分浸漬したものを検査検体とした。次の2種類の方法で冷水病菌を分離した。ポア径 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを石の表面に付着させてTobramycinを2.5ppm添加したMCY培地を含むパッドに乗せて約4日間培養し、増殖した菌体からDNAを抽出した（メンブレン法）。石の表面を拭った滅菌不織ガゼを滅菌水中で充分攪拌し、同攪拌水1mLを20倍に濃縮したのからChelex法でDNAを抽出した（ガゼ法）。PPIC遺伝子を標的とするnestedPCRで、冷水病菌の特異的な遺伝子配列の検出を行った。実験は2回実施した。

結果

1 アユの漁獲と冷水病の発病の実態

海部川におけるアユの種苗放流数は、3月4日から4月3日の間にF17種苗73.8万尾、5月14日にF2種苗14.0万尾であった。毎週土日を含む4日間、漁場監視員が遊漁者から聞き取り調査した結果を旬別に集計し、釣獲尾数と時間当たりの友釣りによる釣獲尾数（CPUE）を推定した。上流域では6月下旬に冷水病の発病が確認された後、釣獲尾数、CPUEがともに低下した（図2）。中流域では解禁直後の漁獲尾数は少ないが、8月中旬から9月上旬に釣獲尾数が増加した

（図3）。平成18年8月および平成19年8月下旬から9月の中流域の友釣りが好漁であったことを、漁協関係者は短期継代魚の放流効果だと考えている。聞き取り調査の集計結果でも、同時期の漁獲尾数とCPUEは、短期継代魚を放流しなかった平成17年より高い傾向を示した。放流種苗は天然遡上魚より横列鱗数が少ないことから、釣獲試験で海部川本流から採捕したアユの中の放流魚の割合を計算した。平成18年8月上旬は28%であったが、平成19年8月下旬は83%であった。横列鱗数でF2とF17を区別することはできないが、F17種苗の冷水病発病後の生残率は極めて低いと考えられるので、平成19年8月中旬から9月上旬の友釣りの好漁はF2種苗の放流効果であることが考えられる。

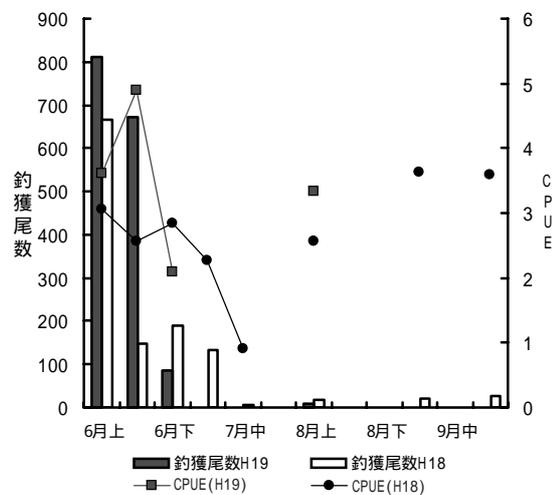


図2 聞き取り調査による海部川上流域の友釣りの旬別のCPUEと釣獲尾数

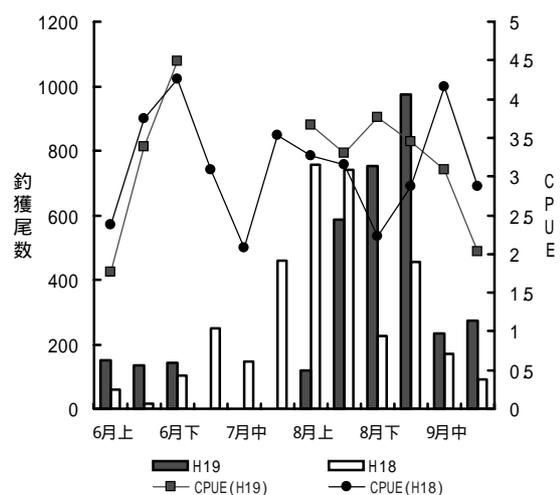


図3 聞き取り調査による海部川中流域の友釣りの旬別のCPUEと釣獲尾数

2 おとりアユ販売店に対する無病アユ種苗の供給

海部川流域でおとりアユ販売業を営む4業者に、冷水病の発病がなく履歴が明らかな種苗を斡旋し、3業者の協力を得ることができた。しかし、1業者は協力を得られず、琵琶湖産の種苗を購入した。アユ漁解禁後の6月下旬に、数力所の友釣り漁場で冷水病の発病が確認された。

3 皮下注射法による攻撃試験と半数致死接種量 (LD₅₀) の測定

攻撃後14日までの累積死亡率 (%) は接種菌量の多い試験区の順に、F17で85.7, 73.7, 55.0, 63.2, F2で73.7, 60.0, 45.0, 25.0, 海産稚魚では85.7, 52.4, 30.0, 5.3 あった (図4, 図5, 図6)。各接種菌量における死亡率についてFisherの正確確率をもとに検定すると、最も低い接種菌量においてF17の死亡率が有意に高い。プロビット法で計算したLD₅₀は、F17で 1.2×10^4 CFU, F2で 1.0×10^6

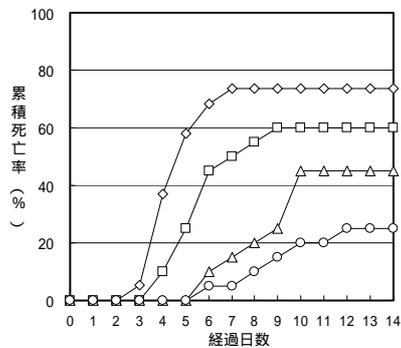


図4 F2の冷水病攻撃試験の死亡率

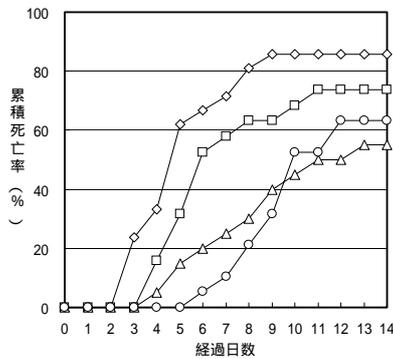


図5 F17の冷水病攻撃試験の死亡率

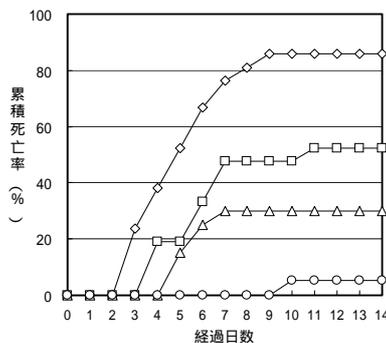


図6 海産稚魚の冷水病攻撃試験の死亡率

CFU, 海産稚魚では 2.4×10^6 CFUであった。

4 F2とF17の比較放流試験

9月13日までに9回の再捕調査を実施し、F17を134尾、F2を109尾再捕した (表2)。放流水域の友釣りの解禁日を7月上旬に延期したために、冷水病の発病 (外観症状より判断) が確認されたのは本流より1ヶ月遅い7月19日であった。7月26日には冷水病によるF17の死亡が、8月9日にはF2の発病が確認された。その後、最終日の9月13日まで発病がみられた。発病率 (冷水病の外観症状を示す再捕魚の割合) は8月14日が最も高く、F17が89%, F2は25%であった。8月30日と9月13日では、F17は発病魚が再捕されず、F2は症状の治癒が認められた。再捕魚に占めるF2の割合は、85%以上に急増した。発病期 (8月以降) の発病率は、F17が70.3%, F2が17.9%であった (図7)。

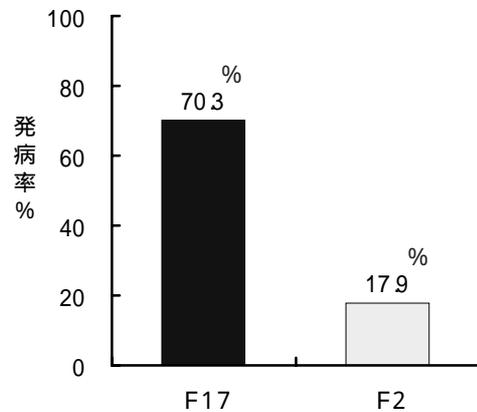


図7 系統別の冷水病発病率

5 再捕魚から検出された*F.psychrophilum* の遺伝子型

6月12日に、F17の鰓洗浄水からA型を検出した。7月26日に2尾のF17からB型を検出した (表3)。8月9日及び10日には鰓洗浄水と脾臓組織から、A型とB型をそれぞれ検出した。鰓と腎臓から分離した菌株からR型は検出されず、全てS型であった。8月14日と30日では鰓洗浄水からB型を検出したが、脾臓組織と分離菌株はA型 (菌株は全てAS型) であった。F17では鰓洗浄水からA型とB型を同じ頻度で検出し、脾臓組織や腎臓の分離菌からもB型を検出した。F2では、鰓洗浄水と脾臓組織および腎臓分離菌からB型を検出した (表4)。冷水病発病期のF17の冷水病保菌率はF2より高く、鰓で約2.7倍、腎臓で約5.9倍であった (表5)。鰓洗浄水、脾臓組織および鰓と腎臓の分離菌が全てB型であったものは、F17で3尾、F2で1尾であった。これらは、B型冷水病菌による発病と考えられる。臓器からB型が検出されたのは、F17で26尾中4尾、F2では13尾中1尾であった。

表2 再捕調査の結果

採捕日	長期継代魚 (F17)				短期継代魚 (F2)				F2の再捕割合 (%)
	採捕尾数	発病魚数	発病率 (%)	平均体重(g)	採捕尾数	発病魚数	発病率 (%)	平均体重(g)	
5月24日	19	0	0	11.8	16	0	0	5.3	45.7
6月12日	54	0	0	20.8	6	0	0	11.6	10.0
7月19日	12	1	8.3	28.8	3	0	0	21.4	20.0
7月26日	12	1	8.3	23.5	6	0	0	13.0	33.3
8月9日	15	13	86.7	27.8	15	2	13.3	24.0	50.0
8月10日	8	5	62.5	27.8	18	3	16.7	26.4	69.2
8月14日	9	8	88.9	22.7	8	2	25.0	18.6	47.1
8月30日	1	0	0	27.5	14	3	21.4	30.8	93.3
9月13日	4	0	0	39.3	23	4	17.4	45.7	85.2

表3 再捕魚から検出された*F. psychrophilum*の再捕日別の遺伝子型

分離器官	処理法	遺伝子型	再捕日						
			6.12	7.19	7.26	8.9/8.10	8.14	8.30	9.13
鰓	洗浄水	A	1	-	-	13	5	1	3
		B	-	-	2	9	1	-	-
	分離菌株	A	-	ND	ND	18	13	1	-
		B	-	ND	ND	2	-	-	-
脾臓	組織	A	ND	ND	ND	5	4	-	3
		B	ND	ND	ND	3	-	-	-
	分離菌株	A	ND	ND	ND	7	7	-	-
		B	ND	ND	ND	5	-	-	-

- ,未検出;ND ,未検査

表4 再捕魚から検出された*F. psychrophilum*の系統別の遺伝子型

系統	鰓洗浄水*		脾臓組織		腎臓の分離菌株	
	A型	B型	A型	B型	AS型	BS型
F2	12 (4)	2	7	1	19	1
F17	10 (2)	10 (6)	5	2	27	6

* 括弧内はAS型及びBS型の検出数

表5 系統別の保菌率

系統	検査魚数	保菌率 (%)	
		鰓	腎臓
F2	78	32.1	11.5
F17	37	64.9	37.8

6 河床の石の付着藻類から冷水病原菌を検出する方法と検出感度について

メンブレン法とガーゼ法で、冷水病原菌の検出感度に差はなかった(表6)。2回の実験結果から、陽性を示す菌液の濃度は $10^{3.5}$ CFU/mL以上であった。河床石を浸漬した菌液を直接検査した場合は $10^{2.4}$ CFU/mLで陽性になったが、付着藻類では菌濃度数が2オーダー高い $10^{4.4}$ CFU/mLで陽性になった(実験2)。アユ漁解禁前と解禁後及び産卵期の産卵場で、両方法により河床の付着藻類を検査した。アユの産卵場で11月22日にガーゼ法で、12月6日にガーゼ法とメンブレン法で陽性になった(表7)。12月6日の遺伝子型はA型であった。10月18日と11月22日に本流で再捕したアユから分離した菌株は全てA型であったことから、成熟により冷水病を発病したアユ親魚が排菌した結果と考えられた。

発病魚の排菌などで河川水中の菌濃度が高い場合を除いて、河床の石の表面の付着藻類から冷水病原菌をPCR法で検出することは難しいと考えられる。メンブレン法とガーゼ法によるPPIC遺伝子を標的とするnestedPCR法で

表6 付着藻類から冷水病原菌を検出する方法の感度の比較

実験回次	菌濃度 (CFU/mL)	陽性率%		浸漬菌液		
		メンブレン法	ガーゼ法			
1	NC	0/2	0	0/5	0	ND
	$10^{0.5}$	0/2	0	0/5	0	ND
	$10^{1.5}$	0/2	0	0/5	0	ND
	$10^{2.5}$	0/2	0	0/5	0	ND
	$10^{3.5}$	0/2	0	1/5	20	ND
	$10^{4.5}$	1/2	50	2/5	40	ND
2	NC	0/2	0	0/5	0	-
	$10^{2.4}$	0/2	0	0/5	0	+
	$10^{3.4}$	0/2	0	0/5	0	+
	$10^{4.4}$	1/2	50	0/5	0	+
	$10^{5.4}$	2/2	100	3/5	60	+

- ,未検出 ;+ ,検出;ND ,未実施

は、河川環境中で冷水病原菌が増生しているかどうかを判断することはできても、感染源の微量な菌数を検出することはできないと考えられる。

表7 付着藻類の冷水病原菌検出調査の結果

採集月日	採集場所	水温 ()	試料	ガーゼ法*	メンブレン法	遺伝子型
5月24日	標識放流水域(上流)	14.9	付着藻類	ND	-	
	標識放流水域(下流)	15.0	付着藻類	ND	-	
5月31日	下流域(高園)	17.1	付着藻類	-	-	
6月12日	標識放流水域(3地点)		付着藻類	-	-	
	中流域(大井堰)		付着藻類	-	-	
11月22日	下流域(産卵場4地点)	17.5	付着藻類	+ (3/20)	-	-
		~18.0				
12月6日	下流域(産卵場周辺3地点)	14.6	付着藻類	+ (1/20)	+ (2/8)	A
		~15.2				

*:ND,未実施 ; -,未検出 ; +,陽性 括弧内,陽性検体数/検体数