

健全な内水面生態系復元等推進委託事業

海部川における冷水病の感染環解明と防疫対策の検討

谷本 剛・竹内 章

河川における冷水病の発生源については、湖産アユの放流との関連が指摘されている。しかしながら、人工産アユのみを放流している河川や、天然遡上アユのみの河川でも冷水病の発生が報告されており、湖産アユの放流以外にも感染源が存在すると考えられている。本県においても、人工産アユのみを放流している海部川で、アユ漁解禁後に冷水病による斃死が度々見られ問題になった。こうしたことから、本調査はアユ種苗を放流する河川における冷水病の感染環を明らかにし、効果的な冷水病の防除対策の確立に資することを目的とする。

なお、本調査は独立行政法人水産総合研究センターの委託事業である健全な内水面生態系復元等推進委託事業「環境調和型アユ増殖手法開発事業（放流効果及び漁業実態調査）」により実施した。

材料と方法

1 アユおよびアユ以外の魚種の冷水病菌保菌検査

各供試魚は海部川の本流下流域から上流域で、刺し網や稚魚ネット等により採集した（図1）。放流アユは徳島県栽培漁業センターで15代目に渡って継代飼育されている海産系人工種苗、湖産アユは海部川流域のおとりアユ店で販売されているおとりアユを用いた。

各供試魚については鰓を、流下仔アユについては魚体全体をホモジナイズしたものを試料とした。これら試料から方法4により作成した冷水病菌分離濃縮液を用いてChelex100でDNAを抽出し、ジャイレースB遺伝子領域（*gyrB*）およびロタマーゼ遺伝子領域（*Fps*）を標的としたnested-PCR法で冷水病菌の検出を試みた。両者の方法が、ともに陽性となった検体をPCR法における陽性検体と判定した。また、外観症状が見られない個体については、鰓および腎臓を、外観症状が見られた個体については患部および腎臓をトブラマイシンおよび馬血清を添加した改変サイトファーガ培地に塗抹して冷水病原菌の分離培養をおこなった。培養温度は4℃とした。

2 河川環境水中の冷水病菌分布調査

河川環境中の冷水病菌の分布を調べる目的で、付着藻類、アオミドロおよび河川水中の冷水病菌の有無を調べた。

付着藻類およびアオミドロは海部川の本流中流域および

相川、小川谷の各支流で採集した。河川水は本流下流域で採集した（図1）。

付着藻類およびアオミドロについては各地点につき3～5個の石からそれぞれ1.0g/個を採集し、それらを合わせたものを試料とした。河川水については1000mlを0.45μmのメンブレンフィルターでろ過し、そのフィルターをホモジナイズしたものを試料とした。これら試料から方法4により作成した冷水病菌分離濃縮液を用いてChelex100でDNAを抽出し、*gyrB*および*Fps*を標的としたnested-PCR法で冷水病菌の検出を試みた。両者の方法が、ともに陽性となった検体をPCR法における陽性検体と判定した。また、冷水病菌分離濃縮液をトブラマイシンおよび馬血清を添加した改変サイトファーガ培地に塗抹して冷水病原菌の分離培養をおこなった。培養温度は4℃とした。

3 冷水病菌の遺伝子型判別

PCR法において陽性となった検体については、制限酵素断片長多型(PCR-RFLP)分析により遺伝子型に基づく判別をおこなった。A、B型の判別は*Fps*-2nd、R、S型の判別は*gyrB*-2ndのPCR増幅産物を用いて実施した。なお、R、S型の判別が困難な検体については、A、B型の判別のみとした。

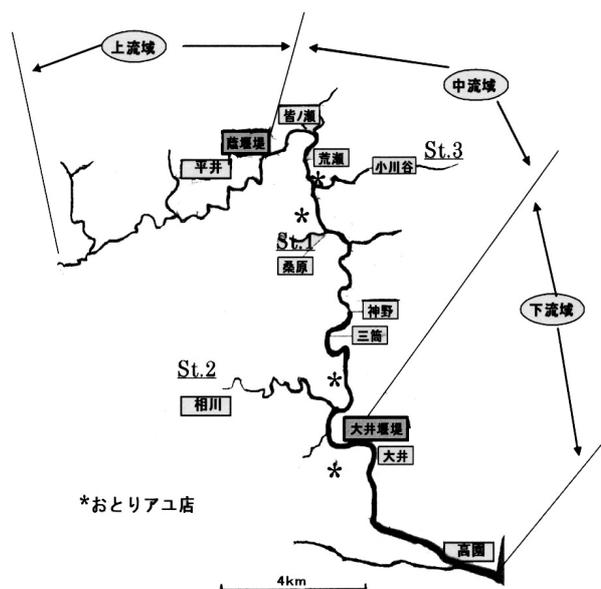


図1 海部川の調査水域図

4 冷水病菌分離濃縮液の作成方法

- 1) 適量の試料に1mlのPBS(-)を加え、30秒間搅拌
- 2) 遠心分離 (500G, 4 , 10分)
- 3) 上清をマイクロチューブに移す
- 4) 遠心分離 (10000G, 4 , 10分)
- 5) 上清を捨てる
- 6) 沈殿物を50 µlのPBS(-)に懸濁させ、10 µlをDNA抽出に用いる

結果

1 放流アユ種苗の冷水病菌保菌検査

海部川に放流された本県の人工産アユ種苗は、PCR法、培養法ともに冷水病菌は検出されず、また、産卵期までの飼育期間中、冷水病による死亡および症状は見られなかったことから、冷水病菌フリー種苗である可能性が高いと考えられた(表1)。

2 おとりアユの冷水病菌保菌検査

海部川流域には4店のおとりアユ店があり、聞き取り調査から、そこで販売しているアユは全て湖産アユであった。6~7月および10月に採集した検体ともにPCR法で冷水病菌が検出され、特に10月の成熟していた検体では、一部冷水病の症状を示すものが見られ、培養法でも冷水病菌が分離された。PCR法において陽性となった検体の遺伝子型は全てAS型であった(表2)。

3 河川で採集したアユの冷水病菌保菌検査

アユ種苗放流前(4月12日)および放流後(5月2日)に採集した遡上稚アユでは、PCR法、培養法ともに冷水病菌は検出されなかった。なお、5月2日の検体は側線上方横列鱗数から全て天然産アユと判別された。6月~10月にかけては、冷水病による斃死が多く見られた時期である6月に採集した検体からPCR法で冷水病菌が検出された。その後、8月の高水温期に採集した検体では冷水病菌は検出されなかったが、同菌の至適発育温度となる9月下旬に採集した検体において再びPCR法で検出された。冷水病菌は人工産、天然産に関係無く検出され、その遺伝子型はAS型ないしA型であった。産卵期である10月下旬に採集した検体では、口吻部の欠損、体表の穴あきといった冷水病の症状を示すものが見られ、PCR法、培養法ともに冷水病菌が高率で検出された。検出率は、産卵期になると河口域から産卵場へ遡上してくる小型のアユ(通称シオアユ)の方が通常の成熟魚より高い値を示した。11月2日および12月9日に採集した流下仔アユでは、PCR法で弱いながら陽性反応を示す検体が確認され、その遺伝子型はいずれもA型であった。

6月9日および6月28日に採集した斃死アユからは、培養

法により高率に冷水病菌が分離された。また、PCR法で陽性となった検体の遺伝子型はAS型であり、一部AR型の混在が疑われる型も確認された。なお、これら斃死アユは側線上方横列鱗数から全個体人工産アユと判別された(表3)。

4 アユ以外の魚種の冷水病菌保菌検査

海部川の代表的な常在魚であるオイカワ、カワムツ、ウグイおよびボウズハゼについて冷水病菌保菌検査を実施した。6月28日および8月25日に採集したオイカワで、各1検体PCR法で冷水病菌が検出されたものの、陽性検体を含め採集した魚種全検体とも特に変わった症状は見られず健全魚であった。海部川ではこれまでアユ以外の魚種において冷水病による大量斃死は確認されておらず、また検出された遺伝子型はA型であったことから、鰓にアユ由来のA型の冷水病菌を保菌していたものと考えられた(表4)。

5 河川環境中の冷水病菌分布調査

アユ漁解禁前である4、5月には全ての採集場所において付着藻類、アオミドロの両試料からPCR法で冷水病菌が高率に検出された。検出された遺伝子型は、S、R型の判別が困難であった検体を除き全てAS型であった。6月9日、6月27日に冷水病による斃死が多く見られた本流中流域の皆ノ瀬、平井で採集した付着藻類では、全検体ともPCR法で冷水病菌が検出され、特に培養法においても同菌が分離された。検出された遺伝子型は、同時期の斃死アユ検体で見られた遺伝子型と同じAS型であった。6月30日、7月28日に採集した検体では、冷水病菌が検出されない水域が見られたものの、同菌の検出率は依然高い率を示し、6月30日にSt.2で採集したアオミドロからはAR型が1検体検出された。その後は、8月26日にSt.3、9月27日にSt.1で採集した付着藻類から冷水病菌が各1検体のみ検出され、徐々に検出率が低下する傾向が見られ、10月27日に採集した検体では同菌は検出されなかった。なお、9月27日の陽性検体から初めてB型の冷水病菌が検出された。12月9日にはアユ産卵場の下流で採集した付着藻類および河川水から冷水病菌が検出された。検出された遺伝子型は、産卵期のアユ検体で見られた遺伝子型と同じAS型であった。河川にアユが存在しないと思われる冬期の12月26日、1月24日に採集した検体からは冷水病菌は検出されなかった。

培養法における冷水病菌保菌検査では、6月9日、6月27日に採集した検体を除き、全検体ともに冷水病菌以外の水中常在菌またはカビの繁殖により冷水病菌は分離できなかった(表5)。

考察

海部川においては、湖産アユは放流しておらず、冷水病

フリーと思われる人工産アユのみ放流していることから、放流魚が冷水病の感染源である可能性は低いものと考えられた。一方、本研究の結果から、湖産アユであるおとりアユは冷水病菌を保菌しており、また、別途実施した聞き取り調査の結果からも、釣客によるおとりアユの河川への持ち込みおよびおとりアユ販売店からの飼育排水が冷水病を誘発している可能性が示唆されたことから、湖産アユが冷水病の感染源となっていることが強く疑われた。

藻類からはA型に属する冷水病菌が優占して検出され、特におとりアユの持ち込みがないアユ漁解禁日以前にもかかわらず高率で同菌が検出された。このことから、A型に属する冷水病菌は河川環境中に常在している可能性が強いことが示唆された。これら藻類が冷水病の感染源になるかどうかについては今後検討する必要があるが、検出されたのはアユ由来型と思われるA型に属する冷水病菌であったことから、アユへの感染の可能性は充分にあると思われる。ただし、冷水病の発生がアユ漁解禁日以前では見られず、また、遡上稚アユは保菌検査の結果、陰性であったことから、この時期に限って言えば、藻類が保菌している冷水病菌の感染力は低いものと考えられた。

流下仔アユで冷水病菌の保菌が確認されたことについては、産卵期のアユが高率で保菌、発症していることから、親魚からの垂直感染の可能性が考えられた。一方、12月9日にアユ産卵場の下流で採取した付着藻類および河川水が

らも冷水病菌が検出され、その遺伝子型が流下仔アユで検出された型と同じA型であったことから、別の親魚から排菌された冷水病菌もしくは河川環境中に常在していた冷水病菌による水平感染の可能性も考えられる。いずれにせよ流下仔アユが保菌している冷水病菌が、今後、海洋生活期・遡上期といったアユの各生活期においてどのような動態を示すか調査していく必要があると思われる。

本県の人工産アユは15代に渡って長期継代されており、天然アユと比較して遺伝的多様性が著しく低下していることが判明している。著しい遺伝的多様性の低下は、病気や環境変化への耐性など生活力に関わる能力が低下していることを示唆しており、事実、6月に冷水病による大量斃死が見られ、その斃死魚が全て人工産アユであったのはこの理由によるところが大きいと推察される。そのため、このような遺伝的多様性の低下した種苗の放流が冷水病を蔓延させる一原因となっている可能性が考えられることから、おとりアユから排菌された冷水病菌が藻類等を付着基盤として河川環境中に周年にわたり常在している可能性が高い海部川においては、冷水病菌を保菌しているおとりアユを河川に持ち込まないような対策を講じることはもとより、長期継代された種苗に比べて冷水病に強いことが明らかとなってきた継代歴の比較的初期の種苗を放流すべきである。

表1 人工産放流アユ種苗の冷水病菌保菌検査

採集月日	培養法(陽性数/検体数)		PCR法(陽性数/検体数)	種苗
	鰓	腎臓	鰓	
4月12日	0/60	0/30	0/10 [*] (60) ₁	海産系継代15代目

^{*}PCR法の検体数は供試魚6尾をプールしたものを1検体とした

()内の数値はPCR法に供試した尾数

表2 おとりアユの冷水病菌保菌検査

採集月日	種苗	培養法(陽性数/検体数)		PCR法(陽性数/検体数)	遺伝子型
		患部	腎臓	鰓	
6月11日～7月2日	湖産	NT	0/15	3/8 [*] (30) ₁	AS[3]
10月14日	湖産	2/2	2/10	1/5 [*] (30) ₁	AS[1]

^{*}PCR法の検体数は供試魚3～6尾をプールしたものを1検体とした

()内の数値はPCR法に供試した尾数 , []内の数値は検出された遺伝子型の個数

NT: not test

表3 河川で採取したアユの冷水病菌保菌検査

採集月日	採集場所	培養法(陽性数/検体数)		PCR法(陽性数/検体数)	遺伝子型	備考
		患部	腎臓	鰓		
4月12日	大井堰	NT	0/20	0/10 [*] (60)		遡上稚魚
5月2日	大井堰	NT	0/20	0/19 [*] (92)		遡上稚魚
6月21日	神野	0/10(鰓)	0/10	5(W), 2(A)/20 [*] (40)	AS[1(W), 2(A)], A[4(W)]	人工産の割合 9.1%
8月2日	大井堰	NT	0/20	0/9 [*] (44)		人工産の割合 23.5%
9月21日	神野一三筒	NT	0/20	2(W)/9 [*] (33)	AS[2(W)]	人工産の割合 13.8%
10月28日	高園	2(W), 1(A)/3	4(W), 1(A)/20	1(W)/5 [*] (20)	AS[1(W)]	人工産の割合(6.7%) 全てオス(BW42.6g) GSI(4~10)
	高園	4/4, 1/2(鰓)	10/14	1/3 [*] (14)	AS[1]	天然シオアユ(BW9.7g) GSI(4~8.5)
11月2日	高園	0/15(魚体全体)		2/15 [*] (150)	A[2]	流下仔魚
12月9日	高園	0/15(魚体全体)		1/15 [*] (150)	A[1]	流下仔魚
斃死アユの冷水病菌検査						
6月9日	皆ノ瀬	5/10	7/10	NT		全て人工産
6月28日	平井	11/15	13/15	4/4 [*] (15)	AS[2], ASR[?] [2]	全て人工産

^{*}PCR法の検体数は供試魚2~10尾をプールしたものを1検体とした

()内の数値はPCR法に供試した尾数, []内の数値は検出された遺伝子型の個数

W:天然産アユ A:天然産アユ NT:not test

表4 アユ以外の魚種の冷水病菌保菌検査

採集月日	採集場所	魚種	培養法(陽性数/検体数)		PCR法(陽性数/検体数)	遺伝子型
			鰓	腎臓	鰓	
6月28日	神野	オイカワ	0/10	0/10	1/2 [*] (10)	A[1]
		カワムツ	0/15	0/15	0/3 [*] (15)	
		ウグイ	0/5	0/5	0/1 [*] (5)	
		ボウズハゼ	0/15	0/15	0/3 [*] (15)	
8月25日	大井堰	オイカワ	0/20	0/20	1/8 [*] (80)	AS[1]
		ボウズハゼ	0/5	0/5	0/1 [*] (5)	
9月21日	大井堰	カワムツ	0/20	0/20	0/6 [*] (30)	
		ウグイ	0/3	0/3	0/1 [*] (3)	
		ボウズハゼ	0/10	0/10	0/2 [*] (10)	

^{*}PCR法の検体数は供試魚3~10尾をプールしたものを1検体とした

()内の数値はPCR法に供試した尾数, []内の数値は検出された遺伝子型の個数

表5 河川環境中の冷水病菌分布調査

採集月日	採集場所	試料	PCR法(陽性数/検体数)	遺伝子型	水温()	培養法
4月28日	桑原(St.1)	付着藻類	1/3	AS[1]	16.8	
		アオミトコ	2/3	AS[2]		
	相川(St.2)	付着藻類	2/3	AS[2]	16.8	
		アオミトコ	1/6	AS[1]		
5月13日	St.1	アオミトコ	1/4	AS[1]	17.5	
	St.2	付着藻類	3/4	AS[3]	17.2	
5月26日	St.1	付着藻類	1/2	AS[1]	19.0	
		アオミトコ	2/2	AS[1],A[1]		
	St.2	付着藻類	1/2	A[1]	18.5	
		アオミトコ	1/2	AS[1]		
	小川谷(St.3)	付着藻類	2/3	AS[2]	18.4	
6月9日	皆ノ瀬	付着藻類	2/2	AS[2]	19.2	培養+
6月27日	平井	付着藻類	2/2	AS[2]	22.0	培養+
6月30日	St.1	付着藻類	0/2		22.5	
		アオミトコ	1/3	A[1]		
	St.2	付着藻類	1/2	A[1]	24.0	
		アオミトコ	3/3	AR[1],AS[1],A[1]		
St.3	付着藻類	0/3		21.5		
7月28日	St.1	付着藻類	3/3	A[3]	23.5	
	St.2	"	0/3		25.0	
		アオミトコ	0/2			
St.3	付着藻類	1/3	A[1]	22.5		
8月26日	St.1	付着藻類	0/3		25.0	
		"	0/3			
	St.2	アオミトコ	0/2		25.0	
		付着藻類	1/3	AS[1]		
St.3	付着藻類	1/3	AS[1]	22.5		
9月27日	St.1	付着藻類	1/3	B[1]	19.2	
	St.2	"	0/3		19.2	
	St.3	"	0/3		18.0	
10月27日	St.1	付着藻類	0/3		16.8	
	St.2	"	0/3		16.1	
	St.3	"	0/3		15.8	
12月9日	高園	付着藻類	2/3	AS[2]	13.4	
		河川水	1/2	A		
12月26日	St.1	付着藻類	0/3		8.7	
	St.2	"	0/3		5.0	
	St.3	"	0/3		7.5	
1月24日	St.1	付着藻類	0/3		9.6	
	St.2	"	0/3		5.1	
	St.3	"	0/3		7.2	

[]内の数値は検出された遺伝子型の個数