

アユの各生産段階における冷水病原菌の保菌状況

福永 剛・浜崎 稔洋
(内水面研究所)

Detection of Cold-Water Disease Pathogen(*Flavobacterium psychrophilum*) in Ayu at Each Culture Stage

Takeshi FUKUNAGA, Toshihiro HAMASAKI
(Fresh Water Laboratory)

冷水病は*Flavobacterium psychrophilum*を病原体とする細菌性の疾病で、1948年アメリカ合衆国のギンザケから初めて原因菌が分離された。その後、本疾病の発生は、アメリカ、ヨーロッパおよび日本におけるニジマス、ギンザケなどの多くのサケ科魚類で認められている。さらに1988年に日本の養殖アユから本菌が分離されて以来、多くの県からアユ養殖場での本疾病による被害が報告されるようになった*1。また、1993年以降、河川に生息するアユについても本疾病の発病ならびに保菌が認められ、全国的に大きな問題となっている。本県では1994年に初めて養殖アユに発病がみられて以来、散発的な被害が生じている。また、1999年6月に筑後川で漁獲されたアユから本菌が分離され、養殖業のみならず河川漁業に対しても、健全な種苗の供給など、本疾病への対応が必要となっている。

本疾病の対策として、まず感染経路の特定が重要と考えられるが、未だ明らかにされていない。本研究では、アユの各生産段階においてPCR検査による冷水病原菌の保菌検査を行ったところ、垂直（経卵）感染を強く示唆する結果が得られたので報告する。

方 法

1. 検査に用いた試料

(1) 親魚

親魚には表1に示したように'96年9月および'99年8月にサンプリングした魚体を用いた。両者は同一系統で、継代中の'94年に冷水病の罹病歴がある。試料摘出箇所は'96年の検査では体表、'99年の検査では鰓および腎臓である。

表1 PCR検査に供したアユ親魚

試料採取日	継代数	平均体重(g)	検査尾数	罹病歴
1996/9/10	研究所継代魚F ₉	—	15	2代前
1999/8/25	研究所継代魚F ₁₂	133.1	35	5代前

(2) 発眼卵

'96年10月および'97年10月に養成親魚（研究所養成親魚F₉およびF₁₀）から採卵し、受精後1週間経過した卵を用いた。サンプリングまでの間、1日おきに3回のマラカイトグリーン消毒を行った。発眼卵はサランロックに付着した状態で検査まで-80℃で保存しておき、検査時に1粒ずつホモジナイズして試料とし、由来親魚別に22粒ずつの検査を行った。

(3) 海水飼育中の仔魚

表2に示したように、矢部川漁業協同組合養殖場および内水面研究所で採卵され、その後、福岡県栽培漁業公社において海水中で飼育されていた、これら2群の仔魚について検査した。前者は3代前に、後者は5代前にそれぞれ、冷水病罹病歴がある。同時期にS県産卵およびO県産卵由来の種苗についても検査を行った。検査に際し

表2 PCR検査に供した海水飼育中のアユ稚魚

試料採取日	系 統	平均体重(g)	検査尾数	罹病歴
1999/1/7	矢部川魚協継代魚F ₃	0.24	45	3代前
1999/1/7	研究所継代魚F ₁₂	0.21	46	5代前

*1 平成6~11年 アユ冷水病研究部会会議資料

表 3 PCR検査に供した淡水飼育中のアユ稚魚

試料採取日	由来	平均体重(g)	検査尾数	罹病歴
1998/2/23	研究所継代群F ₁₁	2.58	44	4代前
1998/2/23	S県産種苗	2.64	22	不明
1998/2/23	O県産種苗	3.64	22	不明
1999/2/23	矢部川漁協継代魚F ₃	2.39	22	3代前
1999/2/23	研究所継代群F ₁₂	1.33	33	5代前

て、魚体が小さいため魚体前半部を切り取り、その1尾ずつ分をホモジナイズして試料とした。

(4) 淡水飼育中の稚魚

淡水飼育中の稚魚については、表3に示した5群について検査を行った。これらの供試魚は、立花町のアユ等中間育成施設で飼育されていたもので、外見上健全と思われる魚をサンプリングした。検査は1尾ずつについて行い、摘出箇所は鰓および腎臓とした。

2. PCR検査法

テンプレートDNAの抽出法およびPCR法は泉、若林¹⁾の方法を用いて行った。TaqポリメラーゼはTakara社のものを用い、プライマーについてはグライナー・ジャパン社に依頼作成した20F、1500R (1stPCR)、PSY-1、PSY-2(2ndPCR)を用いた。DNAの増幅にはPCR System2400 (PERKIN ELMER社)を使用した。

結 果

(1) 親魚

親魚における検査結果を表4に示した。'96年親魚(研究所継代群F₉)では15尾中1尾(陽性率、6.7%)、'99年親魚(研究所継代群F₁₂)では35尾中5尾(14.3%)から冷水病菌が検出された。また、'99年の陽性の内訳は鰓から2尾(5.7%)、腎臓から3尾(8.6%)であった。

(2) 発眼卵

発眼卵における検査結果を表5に示した。96年および97年の発眼卵で両者とも22個中1個(4.5%)から冷水病菌が検出された。

(3) 海水飼育中の仔魚

海水飼育中の仔魚における検査結果を表6に示した。矢部川漁協継代群F₃で45尾中2尾(4.4%)、内水面研究所継代群F₁₂で46尾中2尾(4.3%)から冷水病菌が検出された。

表 4 アユ親魚におけるPCR検査結果

系 統	検査尾数	検査部位	陽性尾数	陽性率(%)
研究所継代群F ₉	15	体表	1	6.7
研究所継代群F ₁₂	35		5	14.3
		鰓	2	5.7
		腎臓	3	8.6

表 5 発眼卵におけるPCR検査結果

親 魚	検査個数	陽性個数	陽性率(%)
研究所継代群F ₉	22	1	4.5
研究所継代群F ₁₀	22	1	4.5

表 6 海水飼育中のアユ仔魚におけるPCR検査結果

由来	検査尾数	陽性尾数	陽性率(%)
矢部川漁協継代群F ₃	45	2	4.4
研究所継代群F ₁₂	46	2	4.3

表 7 淡水飼育中のアユ稚魚におけるPCR検査結果

系 統	検査尾数	検査部位	陽性尾数	陽性率(%)
研究所継代群F ₁₁	44		2	4.5
		鰓	1	
		腎臓	1	
S県産種苗	22		1	4.5
		鰓	1	
		腎臓	0	
O県産種苗	22		0	0
		鰓	0	
		腎臓	0	
矢部川漁協継代群F ₃	22		0	0
		鰓	0	
		腎臓	0	
研究所継代群F ₁₂	33		0	0
		鰓	0	
		腎臓	0	

(4) 淡水飼育中の稚魚

淡水飼育中の稚魚における検査結果を表7に示した。研究所産継代群F₁₁で44尾中、鰓と腎臓から、それぞれ1尾ずつ計2尾で検出された(4.5%)。S県産種苗では22尾中1尾の鰓から検出(4.5%)され、腎臓からは検出されなかった。さらに、O県産種苗、矢部川漁協継代群F₃および研究所継代群F₁₂からは、冷水病菌は検出されなかった。

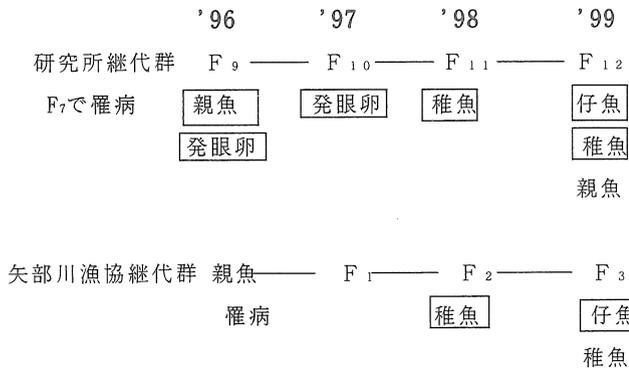


図1 県内継代群における冷水病菌検出状況

□ は陽性

考 察

今回行った親魚、卵、仔稚魚（海水飼育、淡水飼育中）におけるPCR検査の結果をまとめて図1に示した。今回の研究では各年における検査対象が異なっており、すべてのステージで検査できていない。また、対照として罹病歴の全くない群での検査を行っていないなどの不備な点もあるが、過去に罹病歴のある群では陽性となる場合が多く、アユにおいて冷水病菌が垂直感染している可能性が強く示唆された。また、陰性となる場合も2例あったが、これは検査尾数が少なかったため検出できなかったのか、何らかの原因で群として冷水病菌フリーとなっていたことが考えられるが、不明である。

アユ冷水病はここ10年で急速に全国に広まった。その感染経路として、隣接の水槽に感染するいわゆる水平感染は、病魚を用いた同居感染の成立や、病魚の飼育排水で飼育することによって健康魚が発病するなど、よく知られており、また、実際に多くの養殖場で水平感染が起こっている¹⁾。しかし、卵を介して次代に冷水病が伝播する、いわゆる垂直感染（経卵感染）については、その可能性は指摘されているものの、実験的に証明されたという報告は未だ見あたらない。しかし、ギンザケ、ニジマスなどのサケ科魚類では経卵感染が指摘されており、Holt²⁾は成熟したギンザケおよびマスノスケ親魚の卵巣液および精液から冷水病菌が検出されたとしている。さらに、熊谷ら³⁾はギンザケ輸入卵および輸入卵由来の稚魚から冷水病菌が検出されたことから輸入卵が主な感染源としている。また、熊谷ら⁴⁾はギンザケ卵を実験的に感染させたところ、冷水病菌は卵内に侵入し増殖したとしている。本研究においても発眼卵に原因菌が認められたことから、アユについても経卵感染の可能性はあるが、今回の実験ではホモジナイズしたものを試料としているため、原因菌が卵の表面に存在するのか、内部に侵入しているのか

などは不明である。また、飯田、溝上⁵⁾は冷水病原因菌 *F. psychrophilum* は試験管内の実験では、1.5%以上のNaCl濃度では発育しないとしている。しかし、今回海水飼育中の仔魚から検出されたことは、魚体内保菌である可能性を示しており、海水飼育中における魚体内での原因菌の動態について検討する必要がある。また、今回の検査で陽性となった群においても発病はみられておらず、仮に保菌していたとしても、飼育方法の如何によって発病を未然に防ぐこともできると考えられた。

要 約

- 1) 冷水病の垂直感染の可能性をみるために、アユの各生産段階においてPCR検査による冷水病菌の保菌検査を行った。
- 2) '96年親魚では15尾中1尾（陽性率、6.7%）、'99年親魚では35尾中5尾（14.3%）で冷水病菌が検出された。
- 3) '96年および'97年の発眼卵では両者とも22個中1個（4.5%）で冷水病菌が検出された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、PCR検査による冷水病菌の検出方法をご指導いただいた東京大学大学院農学生命科学研究科の若林久嗣教授ならびに泉庄太郎氏に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Shotaro Izumi and Hisatsugu Wakabayashi: Use of PCR to Detect *Cytophaga psychrophila* from Apparently Healthy Juvenile Ayu and Coho Salmon Eggs, *Fish Pathology*, 32, 169-173 (1997).
- 2) R.A.Holt, J.S.Rohovec and J.L.Flyer: Bacterial cold-water disease. *Bacterial Disease of Fish* (ed. by V.Inglis, R.J.Robert and N.R.Bromage), Blackwell Sci.Publ.London, 1993, pp.3-22.
- 3) 熊谷明, 佐藤靖, 高橋清孝: 冷水病の防疫に関する研究. 魚病対策技術開発研究報告書, 平成7年度, 168-174(1995).
- 4) 熊谷明, 佐藤靖, 高橋清孝: 冷水病の防疫に関する研究. 魚病対策技術開発研究報告書, 平成8年度, 108-117(1996).
- 5) Yoshisuke Iida and Akio Mizokami: Outbreaks of Coldwater Disease in Wild Ayu and Pale Chub, *Fish Pathology*, 31, 157-164(1996).