

アユ冷水病細菌の保菌状況と海水飼育時における動態

恵崎 摂・濱崎 稔洋・中本 崇・筑紫 康博・行武 敦
(内水面研究所)

The infection status of the AYU cold-water disease germ and the movement
in seawater breeding

Osamu EZAKI, Toshihiro HAMASAKI,*¹ Takashi NAKAMOTO, Yasuhiro CHIKUSHI*² and Atsushi YUKUTAKE*³
(Freshwater Laboratory)

本県では*Flavobacterium psychrophilum* を原因細菌とするアユの冷水病は1994年に発生が確認されて以降漁業や養殖業に大きな被害や影響を与えている。アユの冷水病では、アユが年魚で主に海域と河川とを回遊する生態をとることから、原因細菌の動態やアユへの感染時期、および感染経路が確定されておらず、薬剤等による治療も難しい現状となっている。そのため本研究はアユの種苗生産現場、特に海水飼育時において *Flavobacterium psychrophilum* の感染実態を把握し防除技術へ利用することを目的として実施した。

方 法

1. 成長段階別保菌状況の把握

福岡県では県栽培漁業公社（以下栽培公社）が県内産と県外産の発眼卵から放流用と養殖用のアユ種苗生産を行い、その後県内の養殖業者がその種苗を用いて放流前の中間育成や養殖を行っている。これらの卵、仔魚、稚魚、親魚等に対して「アユ冷水病防疫に関する申し合わせ事項」¹⁾のPCR法を用いて検査を行い、成長段階別の保菌状況を調査した。

(1) '00 年度

栽培公社で飼育中の仔魚と、その後県内養殖業者が放流用に中間育成した稚魚、及び養殖用に飼育した稚魚から検体を取り調査した。

仔魚は'00年11月1日に5水槽、11月27日に1水槽、'01年1月5日に8水槽からそれぞれ60尾をとり、2尾分をホモジナイズしたもの約10mgを1検体とし、各水槽30検体を検査した。

中間育成の稚魚は'01年2月23日に6水槽から、養殖用の稚魚は2水槽から30尾ずつをとり、1尾ずつ腎臓と鰓洗浄液で検査した。

また、種苗が放流されている矢部川の6ヶ所で7月7日から8月19日に採取された河川アユ142尾について個別に腎臓を検査した。

(2) '01 年度

養殖業者の採卵用親魚と受精卵、栽培公社の仔魚及び稚魚を調査した。

親魚は'01年10月13日に養殖業者が採卵に用いた個体を用い、雌雄それぞれ10尾の腎臓を検査した。受精卵は親魚と同時に100個を採取し、10粒ずつを1検体として検査した。

仔魚は10月25日に栽培公社にて飼育中の5水槽について検査した。各水槽から100尾以上を採取しホモジナイズしたもの約10mgを1検体とし、各水槽6検体ずつ検査した。

稚魚は12月4日に7水槽検査した。水槽ごとに100尾を採取し、大型個体は腎臓のみを、小型個体は筒切りにした躯間部をホモジナイズしたもの約10mgを1検体とし、各水槽6検体ずつ検査した。

*1 現福岡県有明海区漁業調整委員会事務局
*2 現有明海研究所
*3 福岡県栽培漁業公社

(3) '02年度

県内養殖業者で採卵した受精卵と、栽培公社で生産した仔魚、および県内養殖業者で中間育成中の稚魚を検査した。

受精卵は'02年10月28日に養殖業者から採取し、10粒をホモジナイズしたものを1検体とし、それぞれ10検体を検査した。

仔魚は12月29日に飼育中の8水槽について水槽毎に60尾以上を採取し、10尾分の躯間部をホモジナイズしたものの約10mgを1検体として各水槽6検体を検査した。

稚魚は3月11日に3水槽から60尾以上を採取し、2尾を1検体として30検体分について腎臓と鰓洗浄液を検査した。

2. 仔魚への人為感染試験

使用した仔魚には'01年10月23日採卵し、人工海水で飼育したものをを用いた。平均全長は24.7(11.9~38.1)mmであった。冷水病菌株には本県で分離された冷水病菌株(FO 011030)を用いた。

感染試験には、まず冷水病菌の担体として餌のタマミジンコ約1,400尾を1ℓの容器に入れ、冷水病菌を増殖させた液体培地を10ml入れて1時間浸漬した。この時の菌数は 1.4×10^5 CFU/mlで、タマミジンコは成虫43.1%、子虫56.9%の割合であった。

この菌液浸漬タマミジンコをアユ仔魚約300尾を収容した50ℓ水槽に菌液ごと注ぎ入れ、経口による感染試験を試みた。感染試験時の飼育水には地下水を用い、注水

はせずにエアープンプによる通気のみとした。対象区として同様にアユ仔魚約300尾を収容した50ℓ水槽に無冷水病菌タマミジンコを与えた。

翌日にアユ仔魚を30ℓパンライト水槽2個にそれぞれ約130尾ずつ収容し、人工海水の塩分濃度1%、3%の2区に分け飼育した。3%区は30ℓパンライト水槽収容初日に1%、2日目に2%とし、3日目に3%にした。飼育水は水温を一定に保つため1ℓ水槽に地下水をかけ流したウォーターバス方式で行った。飼育期間中の餌はワムシを与え、試験開始から0、5、10、15日目に30尾ずつ取り上げて-80℃で凍結保存した後PCR検査により冷水病菌の有無を調べた。さらに試験中の死亡魚についても凍結保存し検査した。

検査は魚体が小さいため躯間部を10mg程度に筒切りにしたものを使用し、検査に用いたPCR法は前記の「アユ冷水病防疫に関する申し合わせ事項」の方法を用いた。

結 果

1. 成長段階別保菌状況の把握

(1) '00年度

'00年度の保菌検査の結果を表1に示した。

栽培公社で飼育中の孵化直後の仔魚から保菌が確認されたため、保菌率が高かったG4水槽を主とした追跡調査を実施した(図1)。陽性率は11月1日が13.3%、11月27日には3.3%に低下し、'01年1月5日には0%になった。

表1 '00年度の保菌検査結果

検査日	検査地	検体	検査尾数	検査部位	検体由来	陽性率	備考
'00年11/1	栽培公社	仔魚	60	魚体全部	県内産種苗	0%	G4水槽
	同上	同上	60	同上	同上	3.3%	
	同上	同上	60	同上	同上	13.3%	
	同上	同上	60	同上	他県産種苗	0%	
	同上	同上	60	同上	同上	10.0%	
'00年11/27	栽培公社	仔魚	60	魚体全部	県内産種苗	3.3%	G4水槽
'01年1/5	栽培公社	仔魚	300	魚体全部	県内産種苗	0%	5水槽(G4含む)
	同上	同上	180	同上	他県産種苗	0%	3水槽
'01年2/23	養殖業者	稚魚	180	腎臓・鰓洗浄液	県内産種苗	0%	放流用中間育成
'01年2/23	養殖業者	稚魚	30	腎臓	県内産種苗	10.0%	養殖用
	同上	同上	30	鰓洗浄液	同上	16.7%	同上
	同上	同上	30	腎臓	他県産種苗	0%	同上
	同上	同上	30	鰓洗浄液	同上	56.7%	同上
'00年7~8月	河川アユ	成魚	142	腎臓	矢部川(6ヶ所)	0%	7/7~8/18

その後養殖業者による淡水馴致後の中間育成水槽では2月23日の稚魚(体重約1g)の検査は全て陰性であったが、養殖用水槽では冷水病が発生し検体は陽性を示した。

矢部川の河川アユについては全て陰性で保菌は確認されなかった。

(2) '01年度

'01年度の保菌検査の結果を表2に示した。10月13日の受精卵の保菌検査では陽性の検体があったが、海水飼育されている栽培公社の仔魚を10月25日、12月4日に検査した時は検体は全て陰性であった。

(3) '02年度

'02年度の保菌検査の結果は表3に示したとおり、全ての検体が陰性であった。

2. 仔魚への人為感染試験

感染試験の結果を表4に、各試験区のPCR検査の陽性率を図2に、試験区別の死亡尾数の推移を図3に、死亡魚の陽性率を図4に示した。試験期間中の平均水温は18.2℃(17.0~19.0℃)であった。

飼育仔魚の冷水病陽性率は塩分濃度1%区と3%区で差は見られず、ともに冷水病細菌の感染試験区(以下感染試験区)の0日目の陽性尾数は30尾中8尾で陽性率は26.7%、5日目はともに1尾が陽性で陽性率3.3%であり、10日目、15日目はともに陽性の個体は見られなくなった。

また、死亡率は対象区より感染試験区が高く、死亡魚の陽性率も4日目以降はほぼ100%と高かった。

感染試験区のへい死魚は1%区が18尾、3%区が17尾で、うち陽性魚は1%区が12尾で8日目以降は0尾に、3%区が12尾で9日目以降は0尾になった。

対象区のへい死魚は1%区が6尾、3%区が11尾であった。

なお、冷水病細菌感染試験区の生残魚及び対象区のPCR検査結果は全て陰性であった。

考 察

1. 成長段階別保菌状況の把握

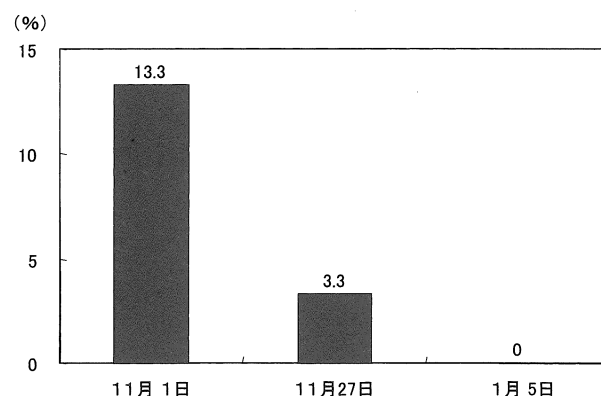


図1 保菌検査陽性水槽の陽性率の推移(栽培公社 G4水槽)

表2 '01年度の保菌検査結果

検査日	検査地	検体	検査尾数	検査部位	検体由来	陽性率	備考
'01年10/13	養殖業者	親魚(雄)	10	腎臓	県内産種苗	0%	
	同上	親魚(雌)	10	同上	同上	0%	
	同上	受精卵	100	卵	上記受精卵	10.0%	10粒/1サンプル
'01年10/25	栽培公社	仔魚	500	魚体全部	県内産種苗	0%	5水槽
'01年12/4	栽培公社	仔魚・稚魚	500	躯間部	同上	0%	5水槽
	同上	同上	200	同上	他県産種苗	0%	2水槽

表3 '02年度の保菌検査結果

検査日	検査地	検体	検査尾数	検査部位	検体由来	陽性率	備考
'02年10/25	養殖業者	受精卵	100	卵	県内産種苗	0%	10粒/1サンプル
'02年12/29	栽培公社	仔魚	300	躯間部	県内産種苗	0%	5水槽
	同上	同上	180	同上	他県産種苗	0%	3水槽
'03年3/11	養殖業者	稚魚	90	腎臓	県内産種苗	0%	3水槽
	同上	同上	90	鰓洗浄液	同上	0%	3水槽

表4 *Cytophaga psychrophila* 感染試験結果

	塩分濃度1%感染試験区	塩分濃度3%感染試験区	塩分濃度1%対象区	塩分濃度3%対象区
サンプル数	122尾	128尾	158尾	141尾
死亡尾数	18尾	17尾	6尾	11尾
累積日間死亡率	15.5%	13.9%	3.8%	8%
P C R 陽性死亡魚数	12尾	12尾	0尾	0尾
死亡魚陽性率	66.7%	70.6%	0%	0%

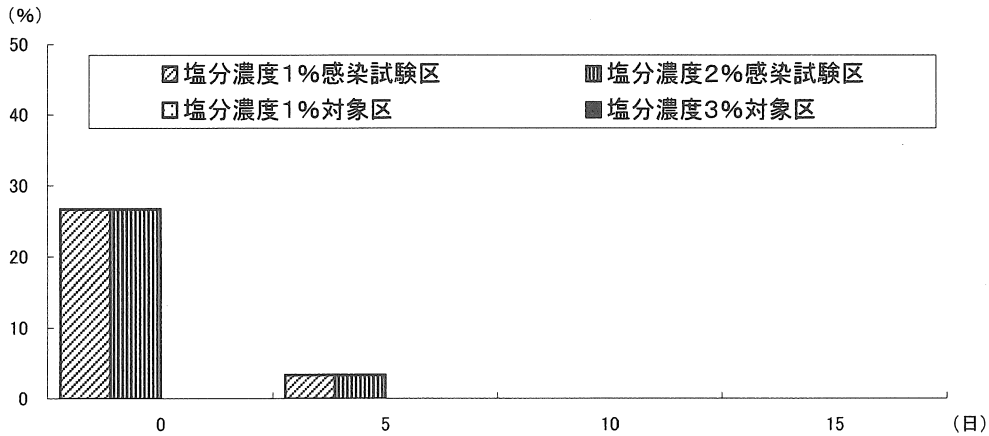


図2 試験区別P C R 検査陽性率

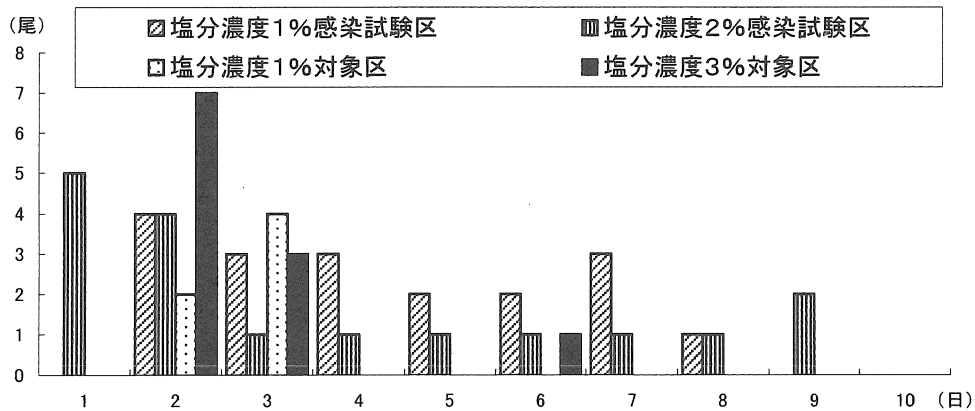


図3 試験区別へい死尾数の推移

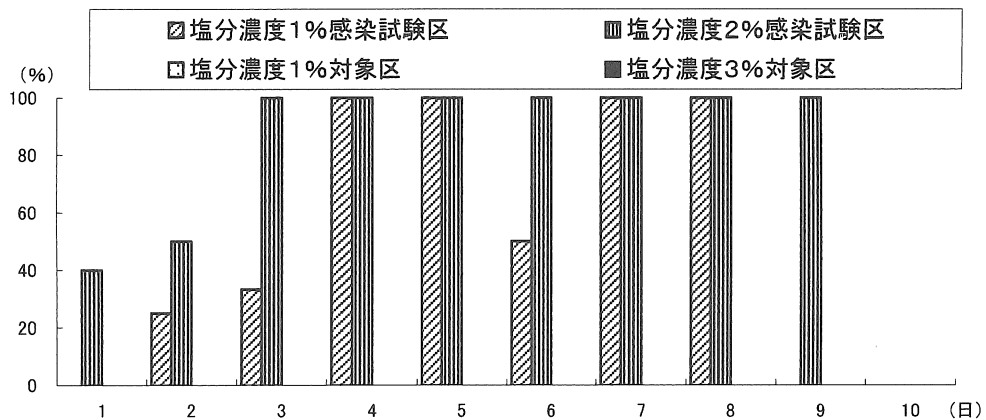


図4 へい死魚の陽性率

採卵から中間育成までの各段階の冷水病菌の保菌状況を調査した結果、'00年に栽培公社のG 4水槽で、PCR検査で陽性反応が出た仔魚がその後陽性率が低下し全て陰性へと変わったことや、'01年、'02年においても海水飼育中の検体が陽性を示さなかったことから、冷水病菌感染魚が海水飼育期間に除去されることが示唆された。また、その後の淡水馴致後の養殖場の保菌検査で陽性反応が出たことから淡水飼育中に感染が起こったことが確認されたが、その後同様事例が発生しなかったため感染源を確認するには至らなかった。感染源を特定するためには菌株のDNAを区別する手法を開発し、検査することが必要と思われる。

2. 仔魚への人為感染試験

タマミジンコを用いた感染試験では、菌浴ミジンコを捕食後にへい死した個体の多くがPCR検査で陽性を示し、9日目まで陽性のへい死魚が出たことから経口感染が成立したことが確認された。感染後の海水飼育試験では栽培公社の生産時と同様に陽性率、へい死数の低下や、感染後のへい死が止まったあとの生残魚が全て陰性であることが確認され、海水飼育により冷水病菌に感染したアユ仔魚は全てへい死することや、死亡魚からの水平感染は起こらなかったと考えられた。

このため今後は淡水馴致後の感染経路を特定することが重要と考えられる。

また今回タマミジンコを用いて平均全長24.7 (11.9～38.1)mm, 0.5g未満²⁾個体への感染が成立したことから、これまで行われた感染試験³⁾で主に用いられた体重2g以上の個体よりも小型の種苗への冷水病菌の経口接種が可能となり、淡水馴致前のワクチン投与などへの応用が期待される。

要 約

- 1) 採卵から種苗放流までの間にPCR法による冷水病の保菌検査を実施し、保菌状況を追跡した。
- 2) 受精卵や孵化仔魚の段階で陽性を示したロットでも稚仔魚期の海水飼育期間中に全て陰性となり、海水飼育による感染魚の除去が示唆された。
- 3) 菌浴ミジンコを用いて海水中での冷水病菌の感染試験を実施し、感染を確認した。
- 4) PCR検査による陽性率の低下と死亡個体のPCR陽性率との関係から、海水中ではへい死魚からの水平感染が起こりにくいことが示唆された。
- 5) 1%海水と3%海水では感染率やへい死に差は見られなかった。
- 6) 淡水馴致後の感染経路の特定が今後の課題と考えられる。

文 献

- 1) アユ冷水病対策研究会：アユ冷水病防疫に関する申し合わせ事項 資料2，2001.
- 2) 野村稔編：新水産学全集16 淡水養殖技術，第1版，恒星社厚生閣，東京，1982，262.
- 3) 全国湖沼河川養殖研究会 アユ冷水病研究部会：アユの冷水病研究 アユ冷水病研究部 平成6年～平成11年度の取りまとめ，徳島，2000，44-49.