

冬期の河川環境中の冷水病菌の動態について*

藤井久之・加藤邦彰・原田慈雄

冷水病は、和歌山県では1991年にアユ養殖場で初めて確認されており、¹⁻²⁾ ほぼ同じ頃から河川においても広がったものと考えられ、その被害は養殖場のみならず河川においても著しい。河川での冷水病被害を軽減するには、原因菌の感染環や動態について把握することが重要である。しかし、冷水病菌が冬期の河川に残存し、春にアユに被害を及ぼすかどうかはほとんど解明されていない。そこで、昨年に引き続き³⁾、冬期の河川環境中における冷水病菌の存在を確認するための試験を行ったので報告する。

材料および方法

河川の石の付着藻類・泥からの冷水病菌の検出 調査地点は、図1に示した有田川の3ヶ所、日高川の3ヶ所とした。調査は有田川においては2006年1月19日から5月15日に、日高川においては2005年12月20日から2006年5月29日にかけて行なった。付着藻類は、岸辺近くの藻類がよく付着している石数個の表面からハブラシで適量そぎ落として採取した。また、泥は岸辺近くものを適量採取した。これらをサンプル瓶に入

れ冷蔵して持ち帰り、図2に示すPCR法で冷水病菌検出を行った。PCR法は、*gyrB*⁴⁾ 及び *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C*⁵⁾ を標的とした nested-PCR 法により行い、2つの領域で陽性となった試料は陽性検体とした。陽性検体は、吉浦ら⁵⁾ 及び泉ら⁶⁾ の方法で遺伝子型の判別を行った。プライマーのシークエンス及

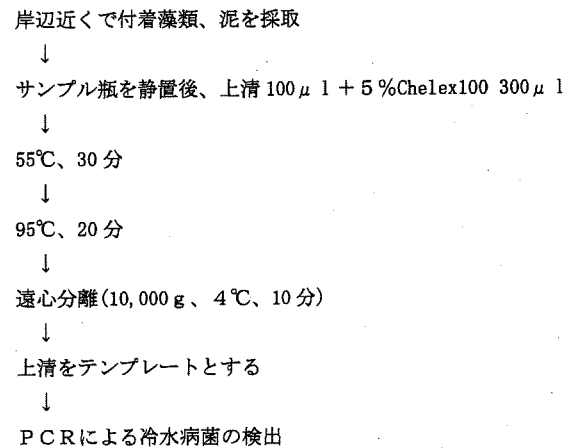


図2 冷水病菌の検出方法

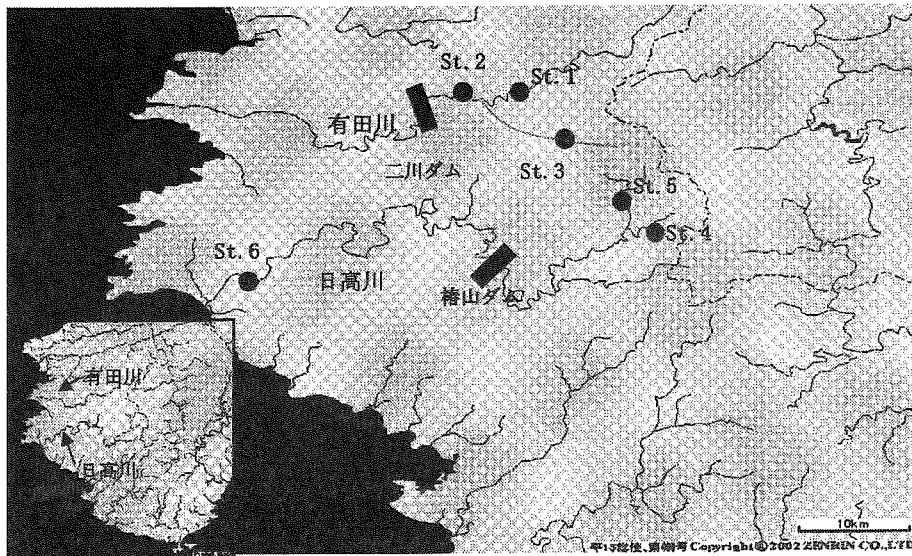


図1 調査地点

※ 環境調和型アユ増殖手法開発事業

びPCRの条件を表1に、PCR反応液の組成を表2に示した。PCRによる増幅産物の確認は1%アガロースゲル、遺伝子型判別の結果確認は3~4%アガロースゲルによる電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色しトランスイルミネーターによる紫外線照射(318nm)により行った。

表2 PCR反応液の組成 単位: μ l

内容	容量
PCR buffer	1.0
2.0mM dNTPS Mixture	1.0
25mM MgCl ₂	0.6
Forward Primer (10 μ M)	1.0
Reverse Primer (10 μ M)	1.0
Ampli Taq Gold polymerase (5U/ μ)	0.05
滅菌超純水	4.35
テンプルート	1.0
合計	10.0

河川の泥を収容した水槽でのアユの飼育試験 試験は、2006年1月21日から3月21日まで60日間行った。方法は、FRP水槽(57×87×50cm、水深37cm、水量約180ℓ)5面の底に厚さ約2cm程度になるよう泥を敷き詰め、これに平均体重2.0gのアユを50尾ずつ収容して十分通気を行い、微流水により飼育し、冷水病によるへい死が生じるかを観察した。なお、泥は種苗放流前に遡上稚魚に冷水病が発生する日高川下流⁷⁾で採取したものをを用いた。試験区は表3のとおりとし、加温はチタンヒーター(200V、1Kw)により行い、適宜給餌を行なった。供試したアユはあらかじめ保菌検査を行い、冷水病菌を保菌していないことを確認したものである。

表3 試験区と内容

試験区	内容	
	泥の有無	水温の状況
1	有	ヒーターで18~19℃に加温
2	有	ヒーターのON・OFFにより11~19℃の間で変動
3	有	ヒーターを用いず
4	無	ヒーターで18~19℃に加温
5	無	ヒーターを用いず

結果および考察

河川の石の付着藻類・泥からの冷水病菌の検出結果を表4、5に示した。有田川ではいずれの試料からも冷水病菌は検出されなかった。日高川についてみると、1月17日のSt.4の藻類からAS型、2月21日の

表4 有田川の石の付着藻類・泥からの冷水病菌の検出結果

月/日	St. 1		St. 2		St. 3	
	砂利・泥	藻類	砂利・泥	藻類	砂利・泥	藻類
2006/1/19	—	—	—	—	—	—
2/13	—	—	—	—	—	—
3/6	—	—	—	—	—	—
4/11	—	—	—	—	—	—
5/15	—	—	—	—	—	—

表5 日高川の石の付着藻類・泥からの冷水病菌の検出結果

月/日	St. 4		St. 5		St. 6	
	砂利・泥	藻類	砂利・泥	藻類	砂利・泥	藻類
2005/12/20	—	—	—	—	—	—
2006/1/17	—	+	(AS)*	—	—	—
2/21	+	(BS)*	—	—	—	—
3/9	—	—	—	—	—	—
4/26	—	—	—	—	—	—
5/29	—	—	—	—	—	—

* 遺伝子型

表1 プライマーのシーケンス及びPCRの条件

領域	プライマー名	シーケンス	熱変性	アニーリング	伸張	最終伸張	サイクル数
gyrB	GYR-1	5'-CAYGCNCGGNGGNAARTTYGA-3'	94℃	42℃	72℃	72℃	40
	GYR-1R	5'-CCRTCACNACRTCCNGCRTCNGT-3'	30 sec	60 sec	90 sec	5 min	
	PSY-G1F	5'-TGCAGGAAATCTTACACTCG-3'	94℃	56℃	72℃	72℃	30
	PSY-G1R	5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3'	30 sec	60 sec	90 sec	5 min	
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	fpPPIC1F	5'-GTACCATGATACCGTCAGGTTTTTATACCA-3'	94℃	60℃	72℃	72℃	35
	fpPPIC1R	5'-GCGTTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCG-3'	15 sec	30 sec	30 sec	5 min	
	FPS-BF	5'-CTTCGATGTGGTTTTCTGTGC-3'	94℃	54℃	72℃	72℃	35
	FPS-BR	5'-GATTGTCTGCAACGGGATTT-3'	30 sec	60 sec	30 sec	5 min	

文献

St.4の砂利・泥からBS型の冷水病菌が検出され、冬期の日高川に冷水病菌が存在している可能性が示唆された。これより、秋期の病魚から排菌された菌が春先まで残存し、放流アユへ感染する可能性が考えられる。今後は、冷水病菌の分離方法を改善し培養法により菌そのものを分離し、さらに分離菌のアユに対する病原性についても検討する必要がある。

河川の泥を収容した水槽でのアユの飼育試験 冷水病を発症しやすくするため、試験開始10日目に各試験区の供試魚を取上げ、3分間の網もみを行い、さらに図3に示したように2区では水温を11.2～19.2℃の範囲で変動させたが、表6に示すようにいずれの試験区でも冷水病は発症せず、今回用いた泥に菌が存在することは証明できなかった。しかし、冷水病菌は条件性病原体でその病原性は弱いとされており、⁸⁾ 河川の泥や石に繁茂する付着藻類という特殊な環境中に生残することでアユに対する病原性が変化したことや感染・発病を起こすに足りる菌数ではなかった可能性もあり、今回の試験では菌が存在したにもかかわらず冷水病が発症しなかったということも考えられる。冬期の河川環境中に冷水病菌がどのような形態で存在するかどうかは、野外調査、PCR検査、室内実験等を行い、様々な情報から総合的に判断する必要がある。

- 1) 宇野悦夫、辻村明夫、見奈美輝彦：魚病対策指導。平成3年度和歌山県内水面漁業センター事業報告、17、33-34(1992).
- 2) 宇野悦夫、辻村明夫、見奈美輝彦：養殖アユの1985～1994年における疾病発生状況。平成7年度和歌山県内水面漁業センター事業報告、21、19-24(1996).
- 3) 藤井久之、加藤邦彰、原田慈雄：冬期の河川環境中の冷水病菌の動態について-I。平成16年度和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場内水面研究所事業報告、30、29-32(2005).
- 4) Izumi,S and H.Wakabayashi : Sequencing of gyrB and Their Application in the Identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathol*, **35** (2), 93-94(2000).
- 5) 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 psychrophilm* の判別と遺伝子型。魚病研究、**41**(2)、67-71(2006).
- 6) Izumi,S.,F.Aranishi and H. Wakabayashi : Genotyping of *Flavobacterium psychrophilm* using PCR-RFLP analysis. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*, **56**, 207-214(2003) .
- 7) 高橋芳明、田上伸治、堀木暢人、宇野悦夫：河川における冷水病調査結果について。平成13年度和歌山県農林水産総合技術センター内水面漁業センター事業報告、27、42-44(2002).
- 8) 井上潔：アユの冷水病。海洋と生物、**126**、35-38(2000) .

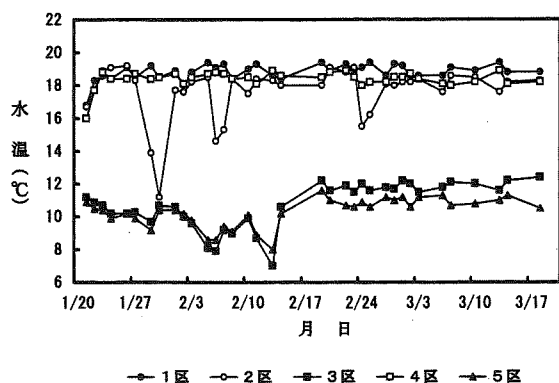


図3 試験期間中の水温の推移

表6 試験期間中の各区のへい死状況

試験区	1区	2区	3区	4区	5区
開始時尾数	50	50	50	50	50
へい死尾数	1	1	4	0	3
冷水病によるへい死尾数	0	0	0	0	0
終了時尾数	49	49	46	50	47
生残率(%)	98	98	92	100	94