

冬期の河川環境中の冷水病菌の動態について— I

藤井久之、加藤邦彰、原田慈雄

冷水病は、和歌山県では平成3年にアユ養殖場で発生が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、冷水病の感染環や冷水病菌の動態について把握することが重要である。特に、河川にアユがいなくなる冬期に冷水病菌が河川で存在するかどうかを把握することは、河川での冷水病対策を講じる上で極めて重要である。河川での冷水病菌の動態については、河川の石の房状付着物から冷水病菌が検出されたという報告があるが³⁾、ほとんど解明されていないのが実情である。そこで、今回、冬期の河川環境中に冷水病菌が存在するかどうかについての検討を行い、若干の知見を得たのでその結果を報告する。

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に示した有田川のダム上流域3ヶ所、富田川2ヶ所とした。付着藻類は、岸辺近くの藻類がよく付着している石を数個採取し、ハブラシで表面の付着藻類を適量そぎ落として採取、泥は岸辺近くの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に示す手順でPCR法と培養法で冷水病菌検出を行った。PCR法は、プライマーに20Fと1500R、PSY 1とPSY 2を用いた16S r DNA領域を標的としたnested PCR法とプライマーにGYR-1とGYR-1 R、PSY-G 1 FとPSY-G 1 Rを用いたgyrB領域を標的としたnested PCR法により行った。プライマーのシーケンス及び

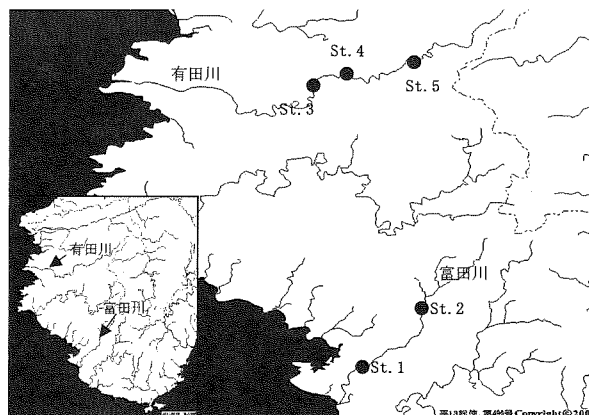
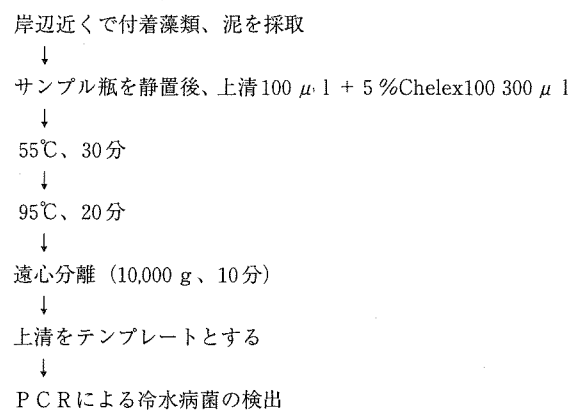


図1 調査地点

PCR法による冷水病菌の検出



培養法による冷水病菌の検出

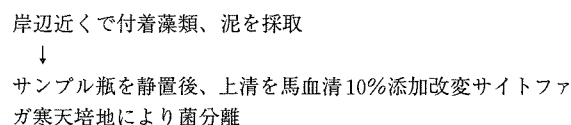


図2 冷水病菌の検出方法

PCRの条件は表1に、PCR反応液の組成を表2に示した。増幅産物の確認は、1%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により行った。

培養法は、馬血清10%添加改変サイトファガ寒天培地を用いて行い、分離された菌は冷水病菌標準株の抗血清によるスライド凝集反応により凝集を確認後、2種類のPCR法（PSY 1とPSY 2による方法及びPSY-G 1 FとPSY-G 1 Rによる方法）により冷水病菌かどうかの確認を行った。

表1 プライマーの塩基配列及びPCRの条件

| プライマー名 | 塩基配列 | 熱変性 | アニーリング | 伸張 | 最終伸張 | サイクル数 |
|-----------|----------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| 20 F | 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' | 94℃ | 51℃ | 72℃ | 72℃ | 30 |
| 1500 R | 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' | 30sec | 90sec | 120sec | 5 min | |
| PSY 1 | 5'-GTTGGCATCAACACACT-3' | 94℃ | 51℃ | 72℃ | 72℃ | 30 |
| PSY 2 | 5'-CGATCCTACTTGCCTAG-3' | 30sec | 90sec | 120sec | 5 min | |
| GYR-1 | 5'-CAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3' | 94℃ | 42℃ | 72℃ | 72℃ | 40 |
| GYR-1 R | 5'-CCRTCNCARTCNGCRTCNGT-3' | 30sec | 60sec | 90sec | 5 min | |
| PSY-G 1 F | 5'-TGCAGGAAATCTTACTCG-3' | 94℃ | 56℃ | 72℃ | 72℃ | 30 |
| PSY-G 1 R | 5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3' | 30sec | 60sec | 90sec | 5 min | |

表2 PCR反応液の組成

単位：μl

| 内 容 | 容 量 |
|------------------------------------|------|
| PCR buffer | 1.0 |
| dNTPS | 0.8 |
| MgCl ₂ | 0.6 |
| Forward Primer (10pmol) | 1.0 |
| Reverse Primer (10pmol) | 1.0 |
| Ampli Taq Gold polymerase (5 U/μl) | 0.05 |
| 滅菌超純水 | 3.55 |
| テンプレート | 2.0 |
| 合 計 | 10.0 |

河川の泥を収容した水槽でのアユの飼育試験 冬期の河川の泥にアユに直接感染する冷水病菌が存在するかどうかをみるため、河川の泥を収容した水槽でのアユの飼育試験を行った。試験区の内容を表3に示した。試験に使用した水槽はFRP水槽（57×87×50cm、水深37cm、水量約180ℓ）5面で、泥は有田川ダム上流域3ヶ所の岸辺近くで採取したものであり、水槽の底に厚さ2cm程度になるように敷詰めた。これに、平均体重3.0～3.2gのアユを50尾ずつ収容し、十分通気を行い、微流水により飼育した。加温はチタンヒーター（200V、1Kw）により行った。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。給餌は、給餌率として2%程度を目安に行い、試験期間中にへい死がみられた場合、冷水病によるものであるかどうかの確認は、馬血清10%添加改変サイトファガ寒天培地による菌分離と2種類のPCR法（PSY 1、PSY 2による方法とPSY-G 1 F、PSY-G 1 Rによる方法）により行うこととした。このようにして、アユの飼育を開始し、毎日、へい死がないかどうかを観察した。試験は2回行い、1回目は平成17年1月27日から2月21日ま

表3 試験区と内容

| 試験区 | 内 容 |
|-----|---------------|
| 1 | 泥収容、19～20℃に加温 |
| 2 | 泥収容、水温変動 |
| 3 | 泥収容、非加温 |
| 4 | 泥 無、19～20℃に加温 |
| 5 | 泥 無、非加温 |

で26日間、2回目は3月10日から29日まで20日間行った。冷水病が発症しやすくするため、1回目は開始から14日目に、2回目は開始から8日目に各試験区の供試魚を取上げ3分間の網もみを行った。

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に示した。培養法では、抗血清によるスライド凝集反応により凝集し、冷水病菌と疑われる菌を2種類のPCR法PSY 1とPSY 2による方法及びPSY-G1FとPSY-G1Rによる方法)により冷水病菌かどうかの判定を行ったが、いずれも陰性であった。また、採取物を直接PCRで判定した方法では、16S rDNA領域を標的とした方法のみ陽性になったのが2例、両領域を標的とした方法で陽性になったのが5例、gyrB領域を標的とした方法のみで陽性になった例はなかった。これより、冬期の河川の石の付着藻類・泥に冷水病菌が存在している可能性があると考えられる。今後は、検出された冷水病菌のPCR-RFLPによる遺伝子型⁴⁾や、またこれが春以降にアユに感染するかどうかについて検討が必要である。

抗血清の凝集反応による判定方法とPCR法で結果が大きく異なっているが、培養法で分離された菌が抗血清の凝集反応に反応するがPCR法で陽性にならない例は他にも報告されている。⁵⁾これより、培養法は腎臓のような雑菌の少ない部位から冷水病菌を検出するのに適しているが河川的环境中から採取した雑菌の多い試料からの検出には適していないものと考えられる。培養法、PCR法のどちらをもちいるにしても雑菌の多い試料からの検出には注意が必要である。今後、冷水病菌だけに特異的に反応する抗血清、PCRプライマーの開発が望まれる。

表4 河川の石の付着藻類・泥からの冷水病菌の検出

| 月/日 | 採取場所 | 培養法 | | | P C R | |
|----------|-------------|----------------|-----------|------|---------------------------|----------------------|
| | | 分離された コロニー数 | P C R | | 16 S rDNA (nested PCR) | gyrB (nested PCR) |
| | | | 16 S rDNA | gyrB | | |
| H17/1/12 | 富田川、St.1、藻類 | 4 | — | — | + | — |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 1 | — | — | — | — |
| 1/18 | 有田川、St.1、泥 | 3 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.2、泥 | 0 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.3、泥 | 2 | — | — | — | — |
| 1/21 | 富田川、St.1、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 2/7 | 富田川、St.1、藻類 | 0 | — | — | + | — |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 2/14 | 有田川、St.1、泥 | 1 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.1、藻類 | 3 | — | — | + | + |
| 〃 | 〃、St.2、泥 | 0 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 1 | — | — | + | + |
| 〃 | 〃、St.3、泥 | 2 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.3、藻類 | 1 | — | — | — | — |
| 3/9 | 有田川、St.1、泥 | 0 | — | — | + | + |
| 〃 | 〃、St.1、藻類 | 4 | — | — | + | + |
| 〃 | 〃、St.2、泥 | 1 | — | — | + | + |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.3、泥 | 1 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.3、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 3/15 | 富田川、St.1、藻類 | 0 | — | — | — | — |
| 〃 | 〃、St.2、藻類 | 0 | — | — | — | — |

河川の泥を收容した水槽でのアユの飼育試験

1回目、2回目とも試験期間中に冷水病によるへい死はみられなかった。河川での冷水病は洪水が発生しアユが川の石や砂利に揉まれ、急激に水温が低下した時に発症しやすいことが観察されている。このため、今回の試験では冷水病が発症しやすくするため、1回目は14日目に、2回目は8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、また2区では水温を19℃から1～2日で14℃に急激に下げたのであるが、いずれも冷水病の発生はみられなかった。冷水病の発生は、菌の存在だけでなく、様々な環境条件も関係しているので、今回の結果で冷水病菌が河川の泥に存在しなかったとは断定できない。しかし、アユ漁業という視点で考えればアユに感染するかどうかが重要であるので、再試験を行い、知見を集積する必要があると考えられる。今後は、河川環境中からの冷水病菌の検出を併せて行い、河川における冷水病菌の感染環・動態を検討する必要がある。

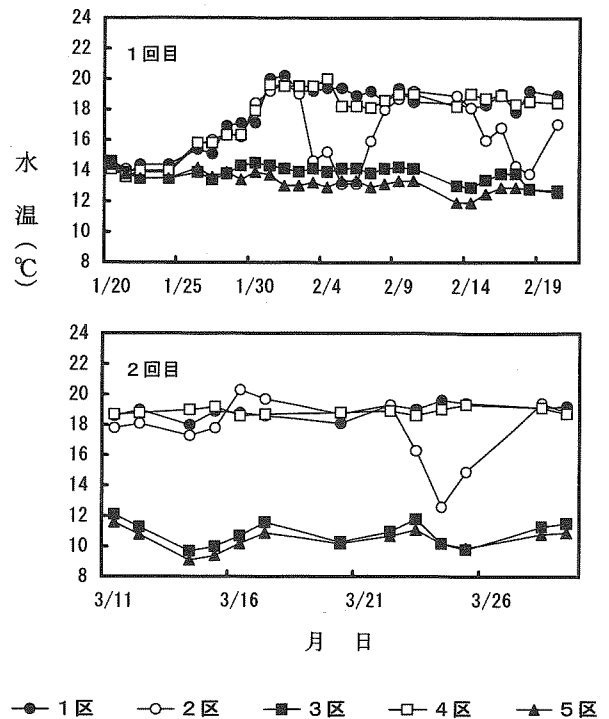


図3 試験期間中の水温の推移

文 献

- 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) アユ冷水病防疫対策共同研究チーム：アユの冷水病の病害発生阻止に関する研究（平成14年度地域連携プロジェクト研究成果報告書）、12 - 22 (2002)。
- 4) Shotaro Izumi, Futoshi Aranishi, Hisatsugu Wakabayashi : Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS, 56, 207 - 214 (2003)。
- 5) 岩谷芳自、池田華子、渡智美：内水面魚類防疫対策事業。平成15年度福井県内水面総合センター事業報告書、30 - 35 (2004)。