

アユ養殖場における冷水病対策—I

～ 河川水および養殖池注水からの冷水病の感染経路の解明 ～

原田英明¹・永江 彬¹・田中 実²・太田政孝²
近藤昌和¹・高橋幸則¹・稲川裕之^{1*}

Prevention of Bacterial Coldwater Disease in Ayu Fish Farm- I Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in River Water and Supplying Water of Culture Pond for Identification of Infection Route

Hideaki Harada¹, Akira Nagae¹, Minoru Tanaka², Masataka Ohta²
Masakazu Kondo¹, Yukinori Takahashi¹ and Hiroyuki Inagawa^{1*}

Bacterial Coldwater Disease (BCWD) of ayu (*Plecoglossus altivelis*) has broken out recently in many rivers and fish farms in Japan. This disease causes serious damage to the ayu culture industry. Fushinogawa Fisheries Corporative Association (FFCA), which has the largest-scale ayu fish farm in Yamaguchi Prefecture, has also suffered from BCWD. For the prevention of BCWD of ayu in fish farm of FFCA, identification of infection route of this causative bacteria (*Flavobacterium psychrophilum*) is thought to be essential, but the study for the detection of invading bacteria into the culture pond has not been performed yet. In the present study, we have investigated the presence of *F. psychrophilum* in river water and supplying water of the culture pond by a sensitive detection method using PCR. *F. psychrophilum* was detected in both sample waters throughout the year, from May 31, 2004 to April 6, 2005. These results demonstrate that *F. psychrophilum* is an indigenous bacterium in the river and invades culture ponds through river-bed water.

Key words : bacterial coldwater disease • *Flavobacterium psychrophilum* • *Plecoglossus altivelis* • river-bed water • PCR

1 緒 言

近年、我が国の河川、養殖現場においてアユの冷水病が流行しており、天然水域において、平成3年から平成10年の間にアユ冷水病の発生件数が約12倍に増加し、それ以降も発生件数が持続し現在に至っている。また、アユ養殖場は全国に約400あるが、その40～50%で毎年冷水病が発生しており、アユ産業は甚大な被害を受けている*¹。

冷水病は、元来、北米に発生したマスやサケの病気で、グラム陰性長桿菌の*Flavobacterium psychrophilum*を原因菌

とした細菌感染症である¹⁾。低水温5℃で稚魚に発生し死亡率が高いために冷水病 (bacterial coldwater disease) と呼ばれるようになった。しかし、アユの冷水病は低水温(5℃)ではほとんど発生せず、16℃～20℃が発症水温となっており、また稚魚・成魚にかかわらず発生する。そのため、マス類の冷水病菌とは病原体が異なると考えられている*¹。本病の主な症状は鰓や内臓の貧血で、体側や尾部に潰瘍症状を示すものも多いが、その他、下顎に出血や潰瘍症状を示すもの、筋肉や腹腔内に出血を起こすものも見られる。本病は症状が多様であること、病魚からの細菌

1 * アユ冷水病対策協議会取りまとめ (平成16年3月)

2006年1月18日受付。Received January 18, 2006.

1 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University, 2-7-1 Nagata-honmachi, Shimono-seki, Yamaguchi 759-6595, Japan).

2 榎野川漁業共同組合 (Fushinogawa Fisheries Corporative Association, Yamaguchi, Yamaguchi 753-0831, Japan)

* 別刷り請求先 (Corresponding author)

分離が不安定であること、自然界での伝染が速やかであること等、これまでの細菌性疾病の病態とは幾つか異なる特徴を有している。

山口県において、養殖アユの中間育成のほとんどは樫野川漁業協同組合（以下、樫野川漁協）が行なっている。河川への放流、他の養殖場へ搬出などを山口県だけでなく他県にもわたり、その出荷総数は毎年約200万尾に達している。ところで、樫野川河川と樫野川漁協のアユ養殖場においても近年冷水病が発生している。本養殖場では冷水病による死亡が年間で約5万尾に達する年があり、大きな被害を受けている。そのため、抜本的な冷水病の対策が求められているが、感染経路が未だ明らかになっておらず、侵入防御対策を確立することが困難な状況である。

淡水魚養殖における感染防御の最も重要な要因は飼育水である。樫野川漁協の養殖池では樫野川からの伏流水を汲み上げて注水している。一般に伏流水は河川水が河床に浸透し地層を通過する際に濾過されるために細菌等の混入が少ないとされている。ところが、樫野川漁協の養殖場では河川水の濁りが伏流水に反映することを経験しており、その水質は河川水の影響を受け易いと考えられる。このことから、河川に存在する冷水病菌が除去されずに伏流水に混入し、注水から養殖池に侵入している可能性が考えられる。

本研究は冷水病の感染経路を解明することを目的とし、注水中の冷水病原菌（以下、冷水病菌と略す）の存在を明らかにするために、河川水および注水における冷水病菌の検出を行った。各検体（以下、サンプル水と略す）を濾過し、フィルターに冷水病菌をトラップさせ、PCR法で検出を行なったところ、河川・注水ともにほぼ1年間を通して冷水病菌が検出された。

2 材料および方法

2.1 冷水病菌の検出

水からの冷水病菌を検出する方法は網田らの報告²⁾を改良して用いた。樫野川河川水と養殖池の注水（2系統）をそれぞれ2ℓずつ採水した。樫野川漁協の養殖池の注水は2系統あり（注水1, 2）、それぞれ伏流水を汲み上げる場所が約20~30m離れている。冷水病菌は0.3~0.75 μm × 1.5~7.5 μmの長桿菌であるので^{3,4)}、サンプル水中の他の大きな粒子を除くために保留粒子5 μmの濾紙（No. 2, ADVANTEC）を用いて1度目の濾過を行なった。河川水は極めて多くの微生物が存在するために、このサン

ル水よりDNA抽出を行なっても夾雑するDNAが多いために、PCR法で十分な感度を得ることができない。そこで、比較的小さなサイズである冷水病菌の相対量を増すために、その濾過水を1.0 μmフィルター（ADVANTEC）で2度目の濾過を行ない、雑菌または微粒子を除いた。最終的にその濾過水から冷水病菌を回収するために0.2 μmフィルター（MILLIPORE）で濾過を行なった。

さらに検出感度を増加させるために、冷水病菌が低温（4℃）でも増殖できること、トブラマイシンに対する耐性が高いために選択培地があること⁵⁾を利用した培養工程を使用した。すなわち、濾過後の0.2 μmフィルターをトブラマイシン（和光純薬工業）添加（5 μg/ml）の改変サイトファーガ平板培地⁵⁾に貼り付け、4℃で約1週間培養した。

濾過直後、または濾過後培養したフィルターを細かく（約4 mm²程度のフィルター片）切り刻み、そこからTRIzol（Invitrogen）を用いて常法によりDNA抽出を行なった。抽出したDNAをテンプレートとしてnested PCR法（2.3）により冷水病菌DNAを検出した。

培養工程を加えない冷水病菌の検出法（以下、検出法Ⅰ）は2004年5月31日から2005年4月6日まで行ない、培養工程を加えた検出法（以下、検出法Ⅱ）は2004年11月4日から2005年4月6日まで行なった。

2.2 冷水病診断

冷水病に特有の症状である体表の潰瘍、下顎の発赤を有するアユを樫野川漁協の養殖池から採取した。採取したアユの鰓から改変サイトファーガ平板培地（トブラマイシン添加）を用いて菌分離し、冷水病菌特有の黄色コロニーを確認すると共に、本コロニーが冷水病菌であることをPCR（2.3）により確認した。また、鰓の一部からDNAzol（Invitrogen）を用いてDNAを抽出し、nested PCRにより冷水病菌の有無を調べた。

2.3 PCRの反応条件

PCRにはBlend Taq（TOYOBO）を使用し、PCR反応液は全量20 μℓで行った。first PCRにはIzumi et al.の報告に従い、sense primer PSY-1: GTTGGCATCAACACACT, anti-sense primer PSY-2: CGATCCTACTTGCGTAGを用いた⁶⁾。second PCRにはDDBJ accession No. AB078060のデータに基づいて設計したsense primer FPR-1: GATGACGGTCTATGGATTGとanti-sense primer FPR-2: ACGAGCTGACGACAACCATGを用いた。first PCRは94℃

で1分, 55℃で1分30秒, 72℃で1分30秒のプログラムをサーマルサイクラーにて30サイクル行った。first PCRで得られた産物を10倍希釈し, その希釈液1 μ lをテンプレートとし, second PCRを94℃で1分, 55℃で1分30秒, 72℃で1分のプログラムを30サイクル行った。PCR産物5 μ lをエチジウムブロマイド0.5 μ g/ml添加の1.5%アガロースゲルで電気泳動し, トランスイルミネーターによりPCR産物を確認した。

3 結 果

2004年の樺野川漁協の養殖池および樺野川河川からの死亡個体を調査した。その結果, 冷水病症状である体表の潰瘍, 下顎の発赤を有する (Fig. 1) 個体が5月30日から発見された。これらの冷水病症状を有するアユはPCR法で冷水病菌の保菌を検査したところ, 5個体中4個体が強陽性反応で, 1個体が弱陽性反応を示した。一方, 症状の無いアユは5個体中2個体が強陽性反応を示し, 3個体が弱陽性反応を示した。以降, 6月14日と6月29日に同様のサンプリングを行ない, 検査を行なった結果, 症状を有する8個体は全て強陽性反応を示し, 症状の無い18個体から4個体が強陽性反応を示し, 14個体が陰性反応を示した

(Table 2)。以上のことから, 2004年には5月30日以降に樺野川漁協の養殖池のアユが冷水病に感染し, 死亡していることが確認された。

樺野川の河川水および樺野川漁協養殖池の注水中における冷水病菌の有無を検出法 I によって確認した。その結果, 2004年5月31日から2005年4月6日までの河川水および注水の各サンプル水からほぼ1年間を通して冷水病菌が検出された (Table 1)。その期間中の2004年の5月31日か

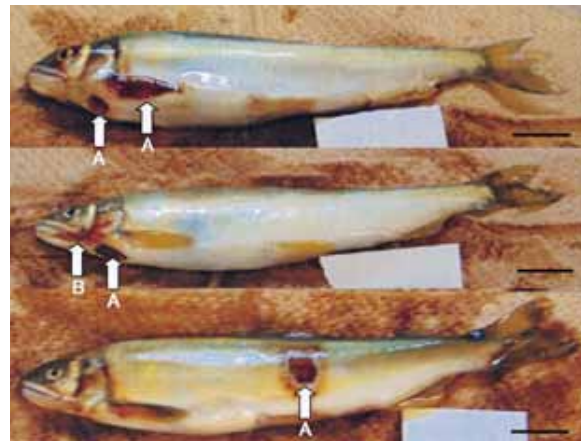


Fig. 1. Typical symptom of bacterial coldwater disease (BCWD). A, Ulceration; B, flare. Bars=2 cm.

Table 1. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in Fushino river water and supplying water 1 and 2 of culture ponds from May 31, 2004 to April 6, 2005

Sampling date	Detection of <i>Flavobacterium psychrophilum</i>		
	River water	Supplying water 1	Supplying water 2
2004 May. 31	- ^{*1}	+	+
Jul. 5	+	+	+
Jul. 28	+	+	+
Sep. 2	+	-	+
Oct. 6	+	+	-
Nov. 4	+	-	+
Dec. 10	- (+) ^{*2}	- (-)	- (-)
2005 Jan. 6	- (+)	- (-)	- (+)
Feb. 10	+	- (+)	+
Mar. 9	+	- (+)	- (-)
Apr. 6	- (+)	- (-)	- (+)

*¹ The result was detected by the method- I.

*² Parenthesis result was detected by the method- II.

+, positive; -, negative.

Table 2. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR in cultured ayu in 2004

	Sampling date	Number of sample	Strong positive	Weak positive	Negative
With symptom	May. 30	5	4	1	-
	Jun. 14	3	3	-	-
	Jun. 29	5	5	-	-
Without symptom	May. 30	5	2	3	-
	Jun. 14	9	4	-	5
	Jun. 29	9	-	-	9

ら11月4日までの河川・注水に関しては、5月31日の河川水、9月2日と11月4日の注水1、並びに10月6日の注水2では冷水病菌が検出されなかったものの、それ以外の14個のサンプル水から冷水病菌の検出が認められた。しかしながら、その翌月の12月10日から2005年4月6日までの各サンプル水では検出法Iによって冷水病菌の検出が認められないものが多くなった。そこで、12月10日以降のサンプル水に関して、2-1に記述した0.2 μ mフィルターを冷水病菌選択培地により冷水病菌を培養する工程を導入した検出法IIを加えた。その結果、河川水では毎月冷水病菌が検出され続けた。注水1では2月10日と3月9日に検出され、注水2では1月6日、2月10日、そして4月6日に検出された。一方、検出法Iについては、河川水では2月10日と3月9日に検出され、注水1では全く検出されず、注水2では2月10日に検出された。

さらに、検出法I・IIの検出感度を比較した例として、2005年1月6日のサンプル水から検出した冷水病菌のPCR産物を、アガロースゲルで電気泳動した写真を示した(Fig. 2)。検出法Iでは全てのサンプルで冷水病菌の検出が確認されなかったが、検出法IIでは5サンプル中4サンプルで検出が確認された。

4 考 察

樺野川河川水と養殖池注水における冷水病菌の有無をPCRにより確認したところ、共に陽性反応を示した。また、養殖池のアユが冷水病の症状を示し、死亡したことから、冷水病菌が河川から伏流水を通り、養殖池の注水から侵入してアユに感染していることが強く示唆された。

伏流水は、河川水が河床に浸透し地層を通過する際に濾過されるために雑菌の侵入の多くを防げることが知られている。ところで、菌のサイズに関して、アユ由来の冷水病

菌は0.3~0.5 μ m \times 3.0~5.0 μ m¹⁾、ピブリオ病の原因菌である*Vibrio anguillarum*は約0.8 μ m \times 2.2 μ m²⁾、シュードモナス病の原因菌である*Pseudomonas plecoglossicida*は約1.0 μ m \times 3.3 μ m³⁾と報告されている。冷水病菌は他の病原菌に比べて、菌体のサイズの小さいものがある。そのため、樺野川の伏流水の冷水病菌に対する濾過能力は他の魚病細菌に比べて低い可能性が考えられる。実際、ほぼ1年間を通して冷水病菌が検出されることから、樺野川の伏流水の自然濾過により冷水病菌は完全に取り除かれないことを示している。

冷水病菌には遺伝子的にアユ型とサケ・マス型があることが報告され⁴⁾、最近では各冷水病菌に対応する特異的なPCRプライマーの開発が求められている。本研究において、冷水病菌検出用のPCRに用いたprimerはサケ・マス型も含めた冷水病菌に反応するものである。アユ冷水病菌に特異的な方法ではないので、検出した冷水病菌にサケ・マス型が混入している可能性がある。しかし、河川に存在する冷水病菌のうちアユ型とサケ・マス型の大きさはほぼ同じであること^{3,4)}から、サケ・マス型のみ伏流水に混入することは考えにくい。従って、樺野川漁協の養殖池でのアユ冷水病菌は河川より伏流水に侵入したことを否定するものではない。

河川からの冷水病菌の検出に関して、網田らは冷水病が毎年発生する河川(新潟県)の1999年5月から12月まで毎月、冷水病菌の検出を試み、12月にのみ陽性反応を認め²⁾。すなわち、アユが河川に存在しない時期にもかかわらず、冷水病菌が存在している可能性を示している。また、今回、我々は検出法I・IIにより河川水から冷水病菌の検出を試みた。Table 1に示すように検出法IIは従来法よりも高感度に冷水病菌を検出することが可能と考えられた。この高感度化した検出法を用いたところ、ほぼ1年間を通して樺野川の河川水に冷水病菌存在することが示された。

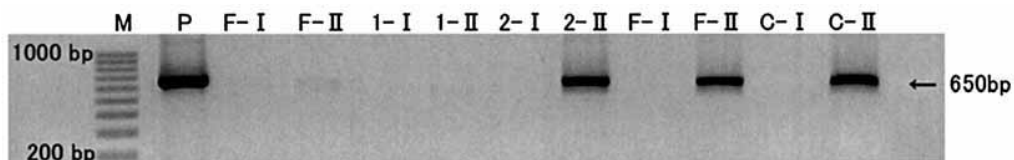


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products for *Flavobacterium psychrophilum*. PCR products were amplified with the primers, for *F. psychrophilum* FPR-1 and FPR-2. Each sample was river water of Fushino river (F), culture pond water of Fushinogawa fish farm (C) and supplying water of culture pond (1 and 2) in January 6, 2005. Each sample was prepared by method-I and-II, respectively. P = *Flavobacterium psychrophilum*. M = DNA Ladder contains ten discrete fragments ranging from 100bp to 1000bp for PCR products.

なお、これらの検出法に関して、最小検出量はまだ確定していないので、本検出法の確立にはさらに検討を要する。これらのことから、冷水病菌は何らかの方法で河川に1年中存在し続ける常在性の病原菌であることが考えられた。養殖池の注水をその河川由来の伏流水を用いている現状において、冷水病菌の養殖池への侵入を防ぐことは困難である。養殖池への冷水病菌の侵入を防ぐ抜本的な対策を施すのであれば、注水をUV処理、オゾン処理または濾過滅菌などを行なう必要があると考えられる。

しかしながら、2004年5月から7月の樫野川漁協の養殖池におけるアユの冷水病による死亡は全体の約2.4%程度であり、多くのアユは発症・死亡していない。このことから、冷水病菌が常在していても通常の飼育条件下では発症せず、水質低下などの二次的な要因が発症に深く関与すると考えられる。この点を解明し回避することができれば冷水病の発症を抑制できる可能性がある。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、冷水病菌株を分与していただいた広島県立海洋技術センター栽培養殖部の永井崇裕氏に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) H. S. Davis : Fish and Wildlife Service, Res. Rep.12, (1946)
- 2) 網田健次郎・星野正邦・本間智晴・若林久嗣：魚病研究, 35, 193-197 (2000).
- 3) M. A. R. Frank : Pakistan J. Biol. Sci., 5 (2), 230-233 (2002).
- 4) M. Kondo, K. Kawai, K. Yagyu, K. Nakayama, K. Kurohara and S. Oshima : Microbiol. Immunol., 45 (12), 813-818 (2001).
- 5) A. Kumagai, C. Nakayasu and N. Oseko : Fish Pathol., 39, 75-78 (2004).
- 6) S. Izumi and H. Wakabayashi : Fish Pathol., 32, 169-173 (1997).
- 7) 室賀清邦・江草周三：口絵4-6. 魚病学概論, 恒星社厚生閣, 東京, 1996.
- 8) S. C. Park, I. Shimamura, M. Fukunaga, K. Mori, and T. Nakai : Appl. Environ. Microbiol., 66, 1416-1422 (2000).
- 9) S. Izumi, F. Aranishi, H. Wakabayashi : Dis. Aquat. Org., 56, 207-214 (2003).