

農林水産省委託事業

魚類防疫技術書
アユの細菌性冷水病



令和2年3月



公益社団法人 日本水産資源保護協会

はじめに

この度、農林水産省委託事業の「養殖衛生管理技術者の養成」において、水産防疫技術者が行う指導に資するための技術書として「アユの細菌性冷水病」を作成いたしました。

1980年代の後半に我が国で発生してから、現在までアユ養殖や河川において甚大な斃死被害を引き起こしている本病については、対策や防除法の開発等、長年にわたり行政機関、研究機関、漁業者が共同して取り組んでおりますところ、農林水産省の委託事業においても、本病に対する調査・研究を行っております。

本書は、近年に農林水産省委託事業において増養殖研究所、滋賀県水産試験場ならびに栃木県水産試験場より実施された調査・研究事業の報告と、アユの細菌性冷水病に深い見識を有する東海大学の泉教授による本病の研究状況の総論で構成されており、関係都道府県の魚病担当者や漁業協同組合等の皆様にご活用いただくために作成いたしました。本書を指針として内水面漁業での魚病対策への一助となれば幸いです。

令和2年3月

公益社団法人日本水産資源保護協会

会長 高橋 正征

目 次

1. アユ細菌性冷水病研究の状況	
東海大学海洋学部水産学科 泉 庄太郎	1
2. 平成 28 年から令和元年度にかけて水産防疫対策委託事業において行われた、 アユ冷水病に関する調査・研究報告	12
平成 28 年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止に係る技術開発等	
① アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発 (増養殖研究所・瀬戸内海区水産研究所)	13
① アユの冷水病に関する加温処理技術の開発 (滋賀県水産試験場)	20
平成 29 年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止に係る技術開発等	
①アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発 (増養殖研究所)	24
②冷水病自然発病魚に対する閉鎖循環飼育による抗病性付与技術の検証 (滋賀県水産試験場)	33
平成 30 年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止にかかる技術開発等 アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発 (増養殖研究所・滋賀県水産試験場)	38
平成 29 年度水産防疫対策委託事業 (水産動物疾病のリスク評価) アユの重要疾病の発生メカニズムの研究 (栃木県水産試験場)	53
平成 30 年度水産防疫対策委託事業 (水産動物疾病のリスク評価) アユの重要疾病の発生メカニズムの研究 (栃木県水産試験場)	60
平成31 年度水産防疫対策委託事業 (水産動物疾病のリスク評価) アユの冷水病の発生状況の把握及び対策の検討 (栃木県水産試験場)	68

1. アユ細菌性冷水病研究の状況

アユ細菌性冷水病研究の状況

東海大学海洋学部水産学科 泉 庄太郎

○原因菌の特徴○

原因菌はグラム陰性好気性細菌の *Flavobacterium psychrophilum* である。細菌性冷水病自体は 1940 年代前半から米国でその発生が知られていたが、本菌が初めて分離されたのは 1948 年、米国のギンザケからである。我が国においては養殖アユで初めて細菌性冷水病の発生が確認されてから程なく 1987 年に本菌が分離された (Borg, 1948; Wakabayashi et al., 1994)。旧学名である *Cytophaga psychrophila*, *Flexibacter psychrophilus* も同菌のシノニムとして知られている (Bernardet et al., 1996)。形態は $0.5\sim 0.7\times 2\sim 7\ \mu\text{m}$ の長桿菌で、まれに $8\sim 12\ \mu\text{m}$ の長さになることもある。栄養豊富な TSA などの普通寒天培地上では発育せず、改変サイトファーガまたは TYE (Tryptone Yeast Extract) などの低栄養の培地上で発育する。これらの低栄養培地上に扁平で少し凸状のコロニーを形成し、フレキシルビン型色素の産生による黄色を呈する。滑走運動能力があるとされるが極めて弱いため、一つの寒天平板上の同じ菌株のコロニーにも辺縁のスムーズなもの和不規則なものが混在することがある。発育は遅く、培地上に肉眼でコロニーを認めるまでに 18°C で 5 日間ほどを要するが、牛胎児血清を 5% 加えることで増殖性が向上する (中津川ら, 2006)。発育可能温度は一般に $5\sim 23^{\circ}\text{C}$, 発育至適温度は $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ で、多くの菌株は 25°C でも発育しない。アユ由来株では 28°C で VBNC (viable but non-culturable) の状態となり、感染性や増殖能力も失うものがある (Sugahara et al., 2010)。食塩濃度 2% 以上では発育せず、カタラーゼ及びチトクロームオキシダーゼは陽性で、ブドウ糖や他の炭水化物を利用しないが、カゼインやゼラチンを分解する (若林ら, 1991; Whitman, 2015; Holt et al., 2016)。

多くの菌株がアンピシリンに感受性で、アユ由来株の多くは DNA ジャイレース A サブユニットの変異によってオキシリン酸に耐性化している (Izumi et al., 2004; Izumi et al., 2005)。トブラマイシンには多くの菌株が耐性傾向を示すことから (Decostere et al., 1997), 後述するトブラマイシン添加培地が本菌の分離用培地として開発されている (Kumagai et al., 2004)。

フランスのニジマスから分離された株を材料として *F. psychrophilum* の全塩基配列が 2007 年に初めて公開され、ゲノム DNA は 2.9 Mbp 弱の環状 DNA で、2400 あまりのタンパク質コード遺伝子を含むと報告された (Duchaud et al., 2007)。その後も世界中で様々な株の全ゲノム情報が解読され、遺伝子データベ

ースに登録されている。

○アユ細菌性冷水病の診断方法○

一般的なアユ細菌性冷水病の診断方法は、検体から菌の分離後、抗 *F. psychrophilum* 血清または PCR (Polymerase Chain Reaction) により分離菌が *F. psychrophilum* であることを同定する方法である。*F. psychrophilum* の分離には、改変サイトファーガまたは TYE などの寒天培地を用い、黄色コロニーを目安に分離、継代培養により純培養する。体表や鰓などからの分離では雑菌の繁殖により、*F. psychrophilum* の分離が困難な場合があるが、トブラマイシンを培地に $5 \mu\text{g/mL}$ 加えることで、雑菌の発育を抑制することができる (Kumagai et al., 2004)。

抗 *F. psychrophilum* 血清を用いた分離菌の同定は、スライド凝集反応が簡便で最もよく用いられる。分離菌が自己凝集する場合には、分離菌液を 100°C 、30 分加熱することで自己凝集が抑えられる場合もあるのでこの処理を試すか、菌液の塗抹スライドを間接蛍光抗体法によって染色して確認することもできる (Izumi and Wakabayashi, 1997)。ただし、抗血清のロットによっては他の菌種との交差反応がある可能性も考慮しなくてはならない。

PCR による *F. psychrophilum* の同定には同菌に特異的ないくつかのプライマーセットが利用可能であるが (Toyama et al., 1994; Suzuki et al., 2008)、アユ細菌性冷水病の診断においては PPIC (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C) 遺伝子領域に設計されたプライマーセットを用いる方法が一般的となっている (吉浦ら, 2006)。

また、定性 PCR 以外の分子生物学的手法を用いたアユ細菌性冷水病の診断方法として、LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法 (Fujiwara-Nagata and Eguchi, 2009) やリアルタイム PCR を用いた方法 (大原ら, 2009) も利用可能である。さらに、原因菌の分離培養を行わずに、これらの血清学的手法や分子生物学的手法を用いた同定方法を応用・改良して、魚体や環境水などから直接 *F. psychrophilum* を確認する方法も開発されている (相川, 1998; Liu et al., 1999; Izumi et al., 2005; Lindstrom, 2009; Long, 2012)。なお、これらすべての方法には程度の差こそあれ検出限界があり、検査結果が陰性であるということは *F. psychrophilum* の存在が 0 であることを意味するものではない。また、最終的な確定診断は、病魚の症状・剖検所見やその他の疫学情報なども加味して総合的に判断しなくてはならない。

○アユ細菌性冷水病の感染機序○

アユ稚魚を *F. psychrophilum* に浸漬感染させて、その後の経過を走査電子顕

微鏡によって観察すると、下顎部や尾柄部に本菌が付着、増殖し、真皮組織を崩壊させる様子が見られる (Kondo et al., 2002)。また、アユの体表にわずかな擦過傷を人為的に作り、*F. psychrophilum*に浸漬感染させると、本菌は真皮の結合組織を経由して筋隔に沿って下層の筋肉組織に拡大して壊死性筋炎を引き起こす。最終的には外部に開放した潰瘍を形成して、河川で発病したアユにしばしば認められるいわゆる「穴あき」症状となる (Miwa and Nakayasu, 2005; 岡村, 2013)。これらのことから、*F. psychrophilum*はアユ体表の何らかの微細な傷を足がかりにアユ表皮内に侵入し、真皮から筋肉組織に重篤な壊死を引き起こすことが一般的な感染メカニズムであり、その結果、体外への出血によって失血死に至ると思われる。

一方で、宿主であるアユ魚体側の *F. psychrophilum* への反応としては、感染耐過したアユ血清の *F. psychrophilum* に対する抗体価が上昇すること (金辻ら, 2007) や、アユに病原性のあるアユ由来 *F. psychrophilum* を非動化していないアユ血清で処理することによって寒天培地上で増殖できる生菌数が著しく増加しするが、同様の処理をアマゴ血清で行うと生菌数が著しく減少する (Nagai and Nakai, 2011) ことなどが知られている。また、アユを *F. psychrophilum* に実験感染させて得た *F. psychrophilum* に対する特異抗体を含むアユ血清を他のアユに接種して受動免疫を付与すると、受動免疫を受けたこのアユ個体は本菌による感染試験において抵抗性を示したり (Kato et al., 2015)、*F. psychrophilum* 感染によってアユ魚体の自然免疫応答のシグナリングに関与するインターロイキン1受容体関連キナーゼ4の発現量が増加したりする (Suzuki et al., 2016)、というような *F. psychrophilum* 感染に対するアユの免疫反応に関する研究も近年多く行われ、本疾病に対する生体防御反応に関する知見も急速に深まってきた。

○*F. psychrophilum*の型別法（血清型と遺伝子型）○

ギンザケ、アユ、ニジマス、およびアマゴ由来の *F. psychrophilum* 菌株を用いて作ったそれぞれの家兎血清を吸収操作することによって、0-1, 0-2, 0-3, および 0-4 の4つの耐熱性0抗原決定基を認識する吸収血清を作製することができる。これらの吸収血清と加熱処理した *F. psychrophilum* 菌体との凝集反応性の組み合わせによって、同菌は少なくとも9種類以上の血清型に分けられる。そのうち、0-2抗原のみを持つ菌株（血清型0-2）と0-2と0-4の抗原を併せ持つ菌株（血清型0-2/4）はアユ分離株にのみ見られ、他魚種からの分離株に0-2抗原をもつものは見つかっていない (Wakabayashi et al., 1994; Izumi and Wakabayashi, 1999; Izumi et al., 2003)。すなわち、0-2の抗原決定基はアユ分離株にきわめて特異的である。海外の *F. psychrophilum* の血清型に関する

文献で Fp^T と表記される血清型に対応するのは 0-1 であり、同様に、Th は 0-3、Fd は 0-4 に対応する。アユの細菌性冷水病はほぼ我が国のみの問題であることから、0-2 に対応する海外の分離株はこれまで知られていない。なお、*F. psychrophilum* の血清型をマルチプレックス PCR によって判別する方法も報告されている (Rochat et al., 2017)

いくつかの *F. psychrophilum* 菌株の抽出 DNA から DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 (*gyrB*) を標的としたユニバーサルプライマーを用いて PCR 増幅すると、DNA ジャイレース同じ II 型トポイソメラーゼである *F. psychrophilum* のトポイソメラーゼ IV の B サブユニット領域 (*parE*) 断片 (1178 bp) に加え、未同定の 290 bp の PCR 産物が得られる。これらの増幅産物を制限酵素 *Hinf* I よって制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析すると、*parE* の切断パターンには違いは認められないが、未同定の 290 bp 遺伝子の切断パターンには 2 つのパターン (A 型及び B 型) が認められる (Izumi et al., 2003)。この方法では再現性が低いことが問題であったが、この 290bp の未同定遺伝子が PPIC (ロタマーゼの一種) であることが明らかになり、その塩基配列に基づき、再現性、特異性の優れた新たな PCR 法 (ロタマーゼ法) が確立された (吉浦ら, 2006)。これまで、ワカサギ、オイカワ、アカザからの A 型株の分離例が報告されてはいるものの、A 型株のほとんどがアユ由来株で構成され、B 型にはアユを含むすべての淡水魚由来株が含まれる。しかし、アユから B 型が検出された場合はほとんどが鰓など体表からであり、腎臓から検出されるのは常に A 型であることから、アユに病原性を有する B 型菌が分離された例もあるが、アユに病原性がある *F. psychrophilum* は A 型に集中していると考えられる。なお、B 型には、コイ科魚類由来のグループに加え、ギンザケ由来株を中心とするグループ (サケ科魚類の *F. psychrophilum* 標準株を含む)、ニジマス由来株を中心とするグループが存在するが、アユ由来 B 型の多くはコイ科魚類由来の菌株と同一グループに属する。

このロタマーゼ法を使った A, B 遺伝子型以外にも、DNA ジャイレース A サブユニット遺伝子、DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子を用いた PCR-RFLP による遺伝子型 (Izumi et al., 2007; Izumi et al., 2019) や、全ゲノム DNA の制限酵素切断パターンをパルスフィールドゲル電気泳動でタイピングする方法 (Arai et al., 2007)、Multi-luciferase Sequence Typing (Fujiwara-Nagata et al., 2013)、プラスミドサイズによるタイピング方法 (Izumi et al., 2005) などの多くの *F. psychrophilum* の遺伝子型分け法が報告されており、そのいずれもが、以下に述べる感染環の解明等のための疫学マーカーとして利用される。

○感染環の解明等○

これまでに *F. psychrophilum* の保菌が疑われる放流アユ種苗やおとりアユ

等を河川へ持ち込むことにより、河川内での感染が広がる実態が多くの水域で確認されているが、保菌検査で陰性が確認された種苗やおとりアユを使用することで、河川内での感染を抑制し漁業被害を軽減できることも実証されている（原ら，2007）。一方で、漁場として利用されず、放流も行われていない河川、あるいは、非保菌種苗を放流している河川でも細菌性冷水病が発症する事例も報告されている。海から遡上した直後のアユから *F. psychrophilum* が発見された事例は発見されておらず、*F. psychrophilum* はその塩分耐性から海水中では生存できないことから、野外ではアユの *F. psychrophilum* が垂直感染する可能性は低いと考えられる。このため、アユが河川にいない時期に *F. psychrophilum* が河川に常在する異魚種中に存在し続けて、アユが遡上してきた時の感染源になるのか、あるいは河川底泥や付着藻類などに本菌が潜んでいて、感染源になるのかという疑問が残されていた。多くの水域で詳細な調査が実施された結果、アユに対する病原性が確認されている A 型の *F. psychrophilum* は極まれにアカザ、オイカワ、カワムツ、ワカサギから検出された（田畑，2004；新井ら，2006；藤井ら，2009；菅原・山本，2003）が、他魚種から検出された *F. psychrophilum* のほとんどが、アユへの病原性の低い B 型であることから（小原ら，2009）、他魚種が感染源になる可能性は極めて低いと考えられた。同じく、冬季に付着藻類から検出されたアユ *F. psychrophilum* は主に B 型の *F. psychrophilum* であり、石の付着物（藻類や泥等）が主要な感染源である可能性は低いことも報告された（原ら，2007）。冬季に河川内で生き残った越冬アユが A 型の *F. psychrophilum* を保有している事例が発見された（宮崎，2008）が、越冬アユが翌年のアユ細菌性冷水病の感染源となるか否かは現時点では不明であり、越冬アユが存在する河川では今後のモニタリング調査が必要である。

参考文献

- Arai, H., Y. Morita, S. Izumi, T. Katagiri and H. Kimura (2007): Molecular typing by pulsed - field gel electrophoresis of *Flavobacterium psychrophilum* isolates derived from Japanese fish. *J. Fish Dis.*, 30, 345-355
- Bernardet, J.F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme (1996): Cutting a gordian knot: Emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family Flavobacteriaceae and proposal of *Flavobacterium hydatis* norn. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 128-48.
- Borg, A. F. (1948): Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. Ph.D. thesis, University of Washington, Seattle.
- Decostere, A., F. Haesebrouck and L. A. Devriese (1997): Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 322-324.
- del Cerro, A, M. C. Mendoza, JA. Guijarro (2002) Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Appl. Microbiol.*, 93, 149-156.
- Duchaud, E., M. Boussaha, V. Loux, et al. (2007): Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nat. Biotechnol.* 25, 763-769.
- Fujiwara-Nagata, E. and M. Eguchi (2009): Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, 32, 873-881.
- Fujiwara-Nagata, E., Chantry-Darmon, C., Bernardet, J. et al. (2013): Population structure of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* at whole-country and model river levels in Japan. *Vet. Res.* 44, 34.
- Holt, R. A., J. Bertolini, K. Cain and A. Long (2016): Coldwater Disease, Standard procedures for aquatic animal health inspections. In FHS blue book: suggested procedures for the detection and identification

- of certain finfish and shellfish pathogens.
- Izumi, S. and H. Wakabayashi (1997): Use of PCR to Detect *Cytophaga psychrophila* from Apparently Healthy Juvenile Ayu and Coho Salmon Eggs., *Fish Pathol.*, 32, 169-173
- Izumi, S. and H. Wakabayashi (1999) Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathol.*, 34, 89-90.
- Izumi, S., H. Liu, F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003): A novel serotype of *Flavobacterium psychrophilum* detected using antiserum against an isolate from amago, *Oncorhynchus masou rhodurus* Jordan & Gilbert, in Japan. *J. Fish Dis.*, 26, 677-680
- Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003): Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Org.*, 56, 207-214.
- Izumi, S. and F. Aranishi (2004): Relationship between *gyrA* mutations and quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 3968-3972
- Izumi, S. and F. Aranishi (2005): Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J. Aquat. Anim. Health* 16, 99-103
- Izumi, S., H. Fujii and F. Aranishi (2005): Detection and identification of *Flavobacterium psychrophilum* from gill washings and benthic diatoms by PCR-based sequencing analysis. *J. Fish Dis.*, 28, 559-564.
- Izumi, S., S. Ouchi, T. Kuge, H. Arai, T. Mito, H. Fujii, F. Aranishi, A. Shimizu (2007): PCR-RFLP genotypings associated with quinolone resistance in *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.* 30. 141-147.
- Izumi, S., H. Arai, K. Suzuki, F. Aranishi (2019): A Novel PCR-RFLP Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* Targeting the *gyrB* Region, *Fish Pathol.*, 54, 37-39.
- Kato G., K. Suzuki, T. Sakai, M. Kawakami, T. Takano, T. Matsuyama, C. Nakayasu (2015): The role of a specific antibody against *Flavobacterium psychrophilum* infection in ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis altivelis*. *J. Fish. Dis.*, 38, 107-12.
- Kumagai, A., C. Nakayasu and N. Oseko (2004): Effect of Tobramycin Supplementation to Medium on Isolation of *Flavobacterium psychrophilum* from Ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, 39, 75-

78.

- Kondo M., K. Kawai, K. Kurohara, S. Oshima (2002): Adherence of *Flavobacterium psychrophilum* on the body surface of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Microbes Infect.*, 4, 279-83.
- Lindstrom, N. M., D. R. Call, M. L. House, C. M. Moffitt and K. D. Cain (2009): A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay and filtration-based fluorescent antibody test as potential tools to screen broodstock for infection with *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Aquat. Anim. Health*, 21, 43-56.
- Liu, H., S. Izumi and H. Wakabayashi (2001): Detection of *Flavobacterium psychrophilum* in Various Organs of Ayu *Plecoglossus altivelis* by *in situ* Hybridization. *Fish Pathol.*, 2 36, 7-11.
- Long, A., M. P. Polinski, D. R. Call, and K. D. Cain. (2012): Validation of diagnostic assays to screen broodstock for *Flavobacterium psychrophilum* infections. *J. Fish Dis.*, 35, 407-419.
- Miwa, S. and Nakayasu C. (2005): Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Organ.* 67, 93-104.
- Nagai T. and T. Nakai (2011): Growth of *Flavobacterium psychrophilum* in fish serum correlates with pathogenicity. *J. Fish Dis.*, 34, 303-310.
- Sugahara, K., E. Fujiwara-Nagata, A. Fukuda, M. Eguchi (2010): Viable but non-culturable state of bacterial cold water disease pathogen, *Flavobacterium psychrophilum*, at various temperatures. *Fish Pathol.*, 45, 158-163.
- Suzuki, K., H. Arai, T. Kuge, T. Katagiri and S. Izumi (2008): Reliability of PCR methods for the detection of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathol.*, 43, 124-127.
- Suzuki, K., S. Izumi, H. Tanaka and T. Katagiri (2016): Identification and expression analysis of IRAK-4 cDNA and its gene from the ayu *Plecoglossus altivelis altivelis*. *Fish. Sci.*, 82, 47-57.
- Rochat, T., E. Fujiwara-Nagata, S. Calvez, I. Dalsgaard, L. Madsen, A. Calteau, A. Lunazzi, P. Nicolas, T. Wiklund, J. Bernardet, E. Duchaud (2017): Genomic Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* Serotypes and Development of a Multiplex PCR-Based Serotyping Scheme. *Front Microbiol.* 8, 1752.
- Toyama, T., K. Kita-Tsukamoto and H. Wakabayashi (1994): Identification

- of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. Fish Pathol., 29, 271-275.
- Wakabayashi, H., T. Toyama and T. Iida (1994) A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. Fish Pathol., 29, 101-104.
- Whitman, W. B. (ed.) (2015): Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. published by John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust; Accessible at: <https://onlinelibrary.wiley.com/>
- 相川英明 (1998): 間接酵素抗体法による養殖アユの細菌性冷水病の診断. 魚病研究, 1998, 33, 149-150.
- 新井肇, 藤田雅弘, 鈴木究真, 片桐孝之, 久下敏宏 (2006): オイカワとアカザから分離された *Flavobacterium psychrophilum* のアユに対する病原性. 水産増殖, 54, 575-576.
- 大原健一, 景山哲史, 桑田知宣, 海野徹也, 古澤修一, 吉浦康寿 (2009): リアルタイム PCR を用いたアユ細菌性冷水病魚における *Flavobacterium psychrophilum* の定量性の検討. 日本水産学会誌, 75, 258-260.
- 岡村貴司 (2013): 養殖アユの胸部の穴あき症状を伴う死亡事例. 魚病研究, 48, 105-108.
- 小原昌和, 沢本良宏, 熊川真二, 傳田郁夫, 川之辺素一, 小川滋, 築坂正美 (2009): 淡水魚から分離された冷水病菌の遺伝子型. 長野県水産試験場研究報告, 11, 1-3.
- 金辻宏明, 山本充孝, 二宮浩司 (2007): 冷水病感染耐過アユの抗病性. 魚病研究, 42, 159-161.
- 菅原和宏, 山本充孝 (2003): *gyrB* を標的とした PCR-RFLP による冷水病菌の型別. 平成 15 年度滋賀県水産試験場事業報告書, 178-179.
- 田畑和男 (2004): 河川における冷水病菌をめぐる在来魚と放流アユとの関係. 日本水産学会誌, 70, 318-323.
- 中津川俊雄, 今西裕一, 新井肇, 永井崇裕, 泉庄太郎 (2006): *Flavobacterium psychrophilum* のための新しい分離用培地. 京都府立海洋センター研究報告, 28, 33-37
- 原徹, 桑田知宣, 斉藤薫 (2007): 河川における冷水病菌の動態 冷水病菌を保菌していないアユ種苗の放流事例. 岐阜県河川環境研究所研究報告, 52, 1-4.
- 藤井久之, 原田慈雄, 小峠利勝 (2009): 有田川における在来魚の冷水病菌保菌状況とカワムツから分離された冷水病菌のアユに対する病原性. 水産増殖,

57, 621-622.

宮崎統五(2008):越冬アユから分離された細菌性冷水病原因菌 *Flavobacterium psychrophilum*. 魚病研究, 43, 167-169.

吉浦康寿, 釜石隆, 中易千早, 乙竹充 (2006): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41, 67-71.

若林久嗣, 堀内三津幸, 文谷俊雄, 星合愿一 (1991): 日本で発生したギンザケ稚魚の細菌性冷水病. 魚病研究, 26, 211-212.

2. 平成 28 年から令和元年度にかけて水産防疫対策委託事業
において行われた、アユ冷水病に関する調査・研究の報告

平成28年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止に係る 技術開発等

① アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発 (増養殖研究所・瀬戸内海区水産研究所)

【目的】アユの冷水病の再発を防ぎ耐病性を付与するため、閉鎖循環系の飼育水槽を活用した効率的な加温処理技術の開発を行う。

【今年度計画】供試魚として琵琶湖産アユ、供試菌株として近年琵琶湖産アユから分離された冷水病菌を用い、閉鎖循環系飼育下において感染魚の同居法により非感染アユを冷水病菌に感染させた後、いくつかの昇温プログラムによる加温処理を行い冷水病による死亡の軽減を確認する。その後感染耐過魚に対し冷水病菌の再攻撃試験を行い、どの昇温プログラムが効率的に冷水病による死亡を抑えるか調べる。

試験1：琵琶湖産アユから近年分離された冷水病菌株の病原性確認試験

【材料及び方法】

供試魚： 琵琶湖産アユ(平均体重 2.2g) 琵琶湖のエリで捕獲され、1g 未満に加温飼育し冷水病菌を除菌したもの。

試験区： PH0424 株(広島県)、SG150804 株(以下 SG08 と省略)(琵琶湖)、SG150124 株(以下 SG01 と省略)(琵琶湖)攻撃区及び無処理区を設けた。

いずれの区も 1 水槽につき 15 尾供試し、攻撃区はディプリケートで実施した。

攻撃方法： いずれの菌株も 1/2CGY にて 72 時間振とう培養後、攻撃菌の濃度をほぼ同様になるよう調整し、供試魚を培養菌液の 100 倍希釈液に 1 時間浸漬した。(培養菌液濃度：PH0424 株 2.7×10^9 CFU/mL、SG08 株 4.6×10^9 CFU/mL、SG01 株 4.6×10^9 CFU/mL)

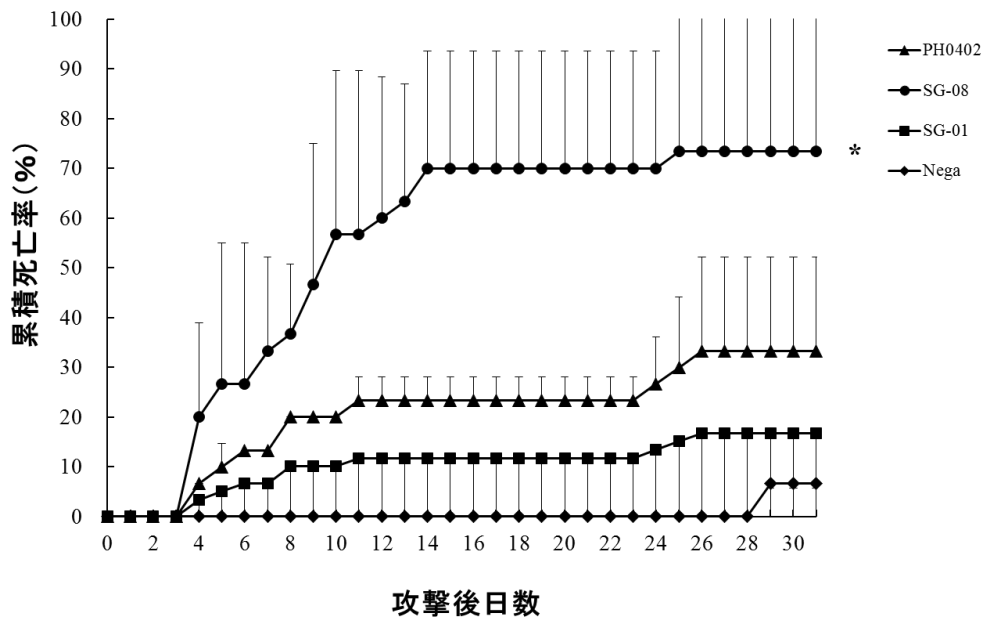
PCR 方法： 腎臓から抽出した DNA を用いて PCR 法(吉浦ら, 2006)により冷水病菌-DNA の有無を調べた。

平均飼育水温： 16.2℃

飼育期間： 31 日間

【結果】

攻撃後の累積死亡率を下記に示す。



* 他の試験区に比べ有意に高い($P < 0.05$)

累積死亡率はSG08株攻撃区が最も高く平均73%であり、他の菌株攻撃区及び無処理区に比べ有意に高かった(Studentのt検定)。PH0424株及びSG01株攻撃区はそれぞれ33%及び12%であった。この結果よりSG08株の琵琶湖産アユに対する病原性が他の菌株に比べ高いことが分かった。

全ての攻撃区の死亡魚からPCR法により冷水病菌-DNAが検出された。試験終了時の生残魚ではPH0424株攻撃区で20尾中3尾から、SG01株攻撃区で17尾中2尾から検出された。SG08株攻撃区の子残魚(8尾)からは検出されなかった。なお、無処理区では15尾中1尾の死亡が観察されたが、その死亡魚から冷水病菌-DNAは検出されず、他の生残魚からも冷水病菌-DNAは検出されなかった。

試験2: 冷水病に対する抗病性を付与させるための効率的な加温プログラムの検討

【目的】

昨年度の試験で閉鎖循環系飼育下において冷水病菌を水平感染させた魚を加温処理することにより、冷水病による死亡を抑制できることが示された。そこで今年度は冷水病に対する死亡を軽減し、さらに効率的に冷水病に対する抗病性を付与させる加温プログラムを検討するため、昨年度と同様、閉鎖循環系飼育下において感染魚から未感染魚へ同居法により冷水病菌を感染させ、3種類のプログラムにより飼育水を加温し冷水病による死亡への加温飼育効果を調べ、その後生残魚に対し冷水病菌の再攻撃試験を実施し最も効率的に冷水病に対する抗病

性を付与させるための加温プログラムを調べた。

1) 加温飼育試験

【方法】

供試魚:琵琶湖産種苗(平均体重 2.3g) 試験 1 と同じロットで冷水病菌フリーのもの。
感染源魚への攻撃方法:1/2CGY にて振とう培養した冷水病菌 SG08 株菌液を 2.3×10^7 CFU/尾で腹腔内(IP)接種した。

試験区及び加温プログラム:

直接 25°C 区:同居感染後に 4 日後(午後)に 25°C へ加温開始し、25°C を 1 日間保持し、次いで 28°C で 3 日間加温飼育し、18°C に戻す。

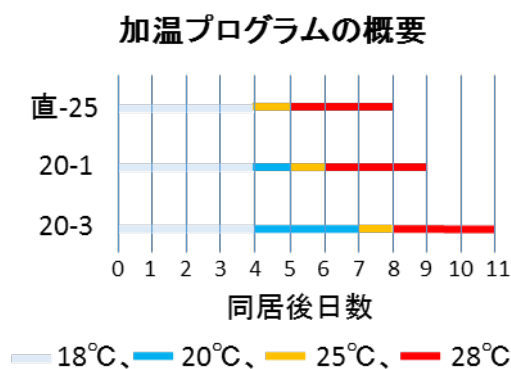
20°C-1 日区:同居感染 4 日後(午後)に 20°C へ加温し 1 日間飼育後、25°C を 1 日間保持し、次いで 28°C で 3 日間加温飼育し、18°C に戻す。

20°C-3 日区:同居感染 4 日後(午後)に 20°C へ加温し 3 日間飼育後、25°C を 1 日間保持し、次いで 28°C で 3 日間加温飼育し、18°C に戻す。

陽性対照区:同居感染後加温を行わない

陰性対照区:非感染(無処理区)

下記に各加温試験区の加温プログラムの概要を示す。



飼育方法:200L 容量円形水槽に感染源として冷水病菌を腹腔内接種した IP 接種魚を 5 尾(ヒレカットにより同居魚と識別)と非感染魚を 95 尾収容し飼育した。25°C への昇温処理を行う前に各昇温処理区から 10 尾を取り上げ冷水病菌の保有状況を調べた。同居感染 28 日後に各区 60 尾については、以下の 2)再感染試験に供試した。循環飼育方法として円形水槽に 12L 容量の観賞魚用ろ過フィルター(150~400L 水槽用)を取り付け循環飼育した。なお、いずれの試験区においても飛沫等による飼育水量の低下を防ぐため、150ml/時で井水を注入した。なお、陰性対照区は無処理とし、100 尾を収容して感染区と同様に飼育した。

飼育水温(加温時以外)

直接 25℃区:17.6℃

20℃-1 日区:18.2℃

20℃-3 日区:18.0℃

陽性対照区:17.8℃

陰性対照区:18.1℃

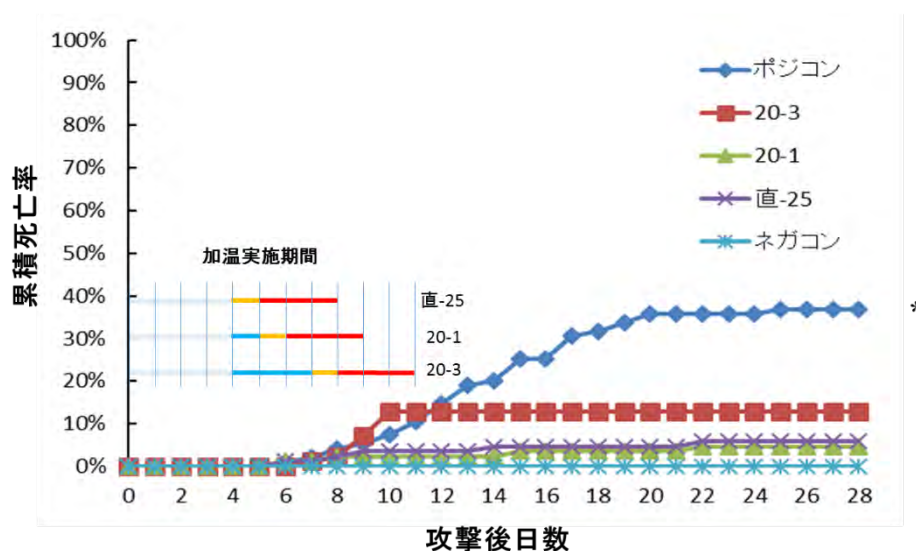
飼育期間:28 日間

水質測定の方法:メルク社製の Spectroquant® Move 100 Colorimeter を用いて、アンモニア濃度及び亜硝酸濃度を週 3 回測定した。

【結果】

いずれの試験区の IP 接種魚は接種 4 日後までに全て死亡し、いずれの個体からも冷水病菌-DNA が検出された。接種 1 日後の午後までに接種魚の死亡率が 80%に達したことから、同居 4 日後の午後から飼育水の昇温を開始した(感染源魚が 80%以上死亡した後 3 日後に同居魚へ冷水病菌が感染していることは昨年度検証済み。)。各加温飼育区において 25℃へ昇温する直前の冷水病菌の保有状況を調べた結果、20℃-1 日区で 10 尾中 2 尾から検出されたのみであった。これは外観的に無症状な魚をサンプルしたため、多少のバイアスが生じたためと考えられる。

試験開始後の同居魚の累積死亡率を下記に示す。



* 他の試験区に比べ有意に高い($P<0.05$)

28 日間の試験期間中、直接 25℃区、20℃-1 日区、20℃-3 日区及び陽性対照区の累積死亡率はそれぞれ 6%、5%、13%及び 37%であり、いずれの加温飼育区の値は加温していない陽性対照区に比べ有意(χ 二乗検定)に低かった。直接 25℃区(5 尾)及び 20℃-1 日区(4 尾)の死亡魚からの冷水病菌の検出は 1 尾のみであった。直接

25℃区の加温前のサンプルからは冷水病菌が検出されていなかったが、この結果から直接 25℃区においても冷水病菌の感染は成立していたことが示された。また、これらの両区の死亡のおよそ半数は加温時に発生しており、冷水病菌が検出されなかった個体の死亡は加温によるストレスや非特異的な死亡と考えられた。一方、20℃-3 日区では死亡した 11 尾中 6 尾から冷水病菌が検出された。その死亡は他の加温区と同様に加温飼育中に集中していることから、20℃で 3 日間保持する間に冷水病の病徴が進行し、さらに加温中によるストレスにより死亡が増長されたのではないかと考えられた。いずれの加温飼育区においても試験終了時に PCR 検査に供した生残魚から冷水病菌は検出されなかった(直接 25℃区;20 尾、20℃-1 日区、21 尾;20℃-3 日区、14 尾)。

陽性対照区では同居開始 6 日後より冷水病による死亡が観察され、ダラダラと試験終了時まで死亡が続いた。死亡個体からは高率(33 尾/35 尾)に冷水病菌が検出され、生残魚からも 60 尾中 7 尾から検出された。

なお、陰性対照区での死亡は全く観察されず、生残魚からも冷水病菌は検出されなかった。

試験期間中のアンモニア濃度 0.09~0.10mg/L 及び亜硝酸濃度は 0.07~0.09mg /L でいずれの試験区において大きな差は無く、今回用いた循環濾過槽は十分機能していたと考えられる。

2) 再感染試験

【方法】

試験区:

直接 25℃区

20℃-1 日区

20℃-3 日区

陽性対照(未感染魚-攻撃)区

陰性対照(未感染魚-非攻撃)区

各区 60 尾を 1 水槽に 15 尾ずつ収容し、腹腔内接種及び浸漬攻撃にそれぞれ 2 水槽ずつ供した。

攻撃方法:

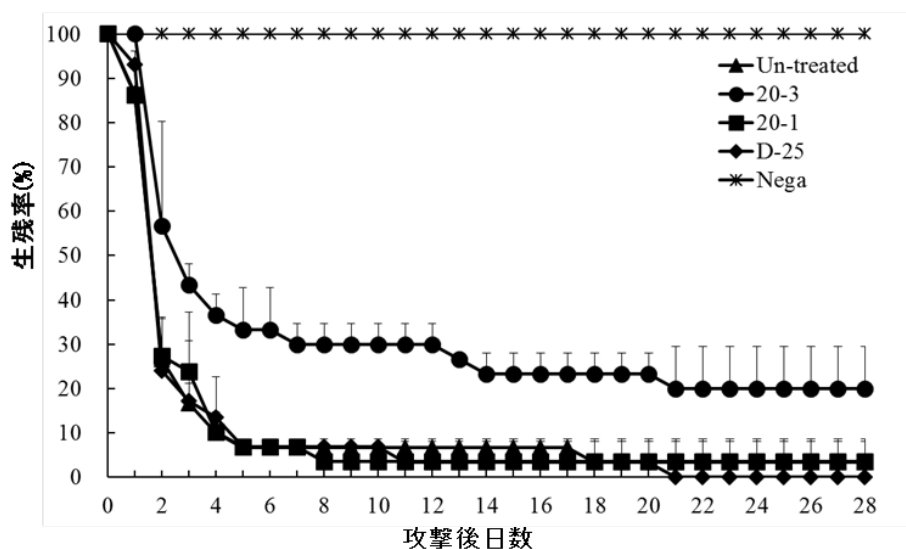
腹腔内接種法:1/2CGY にて振とう培養した冷水病菌 SG08 株菌液を 4.3×10^7 CFU/尾で腹腔内(IP)接種した。

浸漬法:供試魚を上記と同じロットの培養菌液(4.3×10^8 CFU/mL)の 200 倍希釈液に 1 時間浸漬した。

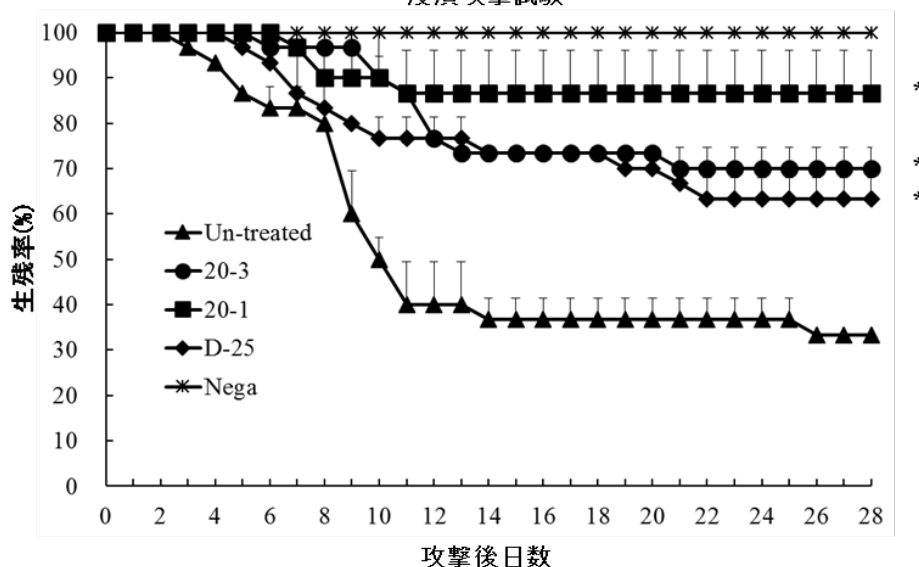
【結果】

各加温飼育区の生残魚に対する IP 接種及び浸漬攻撃後の生残率を下記に示す。

腹腔内接種試験



浸漬攻撃試験



* 陽性対照区 (Un-treated) 区に比べ有意に高い ($P < 0.05$)

IP 接種による冷水病菌再攻撃試験における直接 25℃区、20℃ - 1 日区、20℃ - 3 日区、陽性対照区及び陰性対照区 (非感染区) の生残率はそれぞれ 0%、4%、20%、3%及び 100%であった。Student の t 検定による有意差統計の結果、加温処理の有効性は認められなかったが、20℃ - 3 日区が生残率が最も高く、また死亡

の発生も他区に比べ緩やかであった。

浸漬法による冷水病菌再攻撃試験における直接 25℃区、20℃ - 1 日区、20℃ - 3 日区、陽性対照区及び陰性対照区（非感染区）の生残率はそれぞれ 63%、87%、70%、33%及び 100%であった。Student の t 検定による有意差統計の結果、いずれの加温処理区の生残率も陽性対照区（加温未処理区）に比べ有意に高い値を示し、加温処理による死亡軽減の有効率（ $(1 - \text{加温処理区の死亡率} / \text{陰性対照区の死亡率}) \times 100$ ）は 20℃ - 1 日区が最も高く 79%であり、次いで 20℃ - 3 日区の 53%、直接 25℃区の 42%であった。

IP 接種及び浸漬攻撃の全ての試験区の全ての死亡個体から冷水病菌-DNA が検出された。いずれの区でも IP 接種試験の生残魚（全体で 0/8）からは冷水病菌-DNA は検出されなかった。浸漬攻撃試験ではいずれの試験区でも 1~2 割程度（全体で 10/78）の生残魚から冷水病菌-DNA が検出されたが、検出率に対する試験区間の相違は認められなかった。

今回の結果より、閉鎖循環系飼育下において冷水病菌に感染したアユに加温処理を施すことにより、アユは冷水病に対し耐病性を有することが強く示唆された。その加温プログラムとしては、冷水病菌保有魚が 80%程度死亡した 3 日後に 20℃で 1 日間、その後 25℃で 1 日間次いで 28℃で 3 日間加温するプログラムが加温処理過程も含め最も死亡が少なく効率的であることが示唆された。

伊東尚史・坂井貴光・山崎雅俊（増養殖研究所魚病研究センター 病原体グループ）
山本義久・今井 正・森田哲男・今井 智（資源生産部 養殖生産グループ）

① アユの冷水病に関する加温処理技術の開発 (滋賀県水産試験場)

【目的】

冷水病の再発を防ぎ耐病性を付与するため、閉鎖循環系の飼育水槽を活用した効率的な加温処理技術の開発を行うことを目的とし、今年度はまず、本法の問題点を抽出するため、漁獲された琵琶湖産アユを用いて閉鎖循環系飼育下での加温処理の治療効果および耐病性の付与の有無を調査した。

【材料および方法】

試験①：冷水病人為感染アユの閉鎖循環系飼育下での加温処理

健康なアユを冷水病に人為感染させ、閉鎖循環系飼育下での加温処理を行った。

【供試魚】漁獲後すぐに加温処理した後、地下水（18℃）で養成した冷水病未経験の琵琶湖産アユ（平均体重2.0g）を用いた。

【攻撃方法】供試魚400尾を0.3トンのFRP角型水槽(水量54L)に収容し、別途用意した冷水病自然発病アユの飼育排水約20Lを導入後、止水状態で約1時間維持して感染させた。供試魚は、発病を確認後、直ちに各試験区に分けて供試した。

【試験区】通常のかげ流し飼育下で加温処理する「かけ流し加温区」、加温期間中のみ閉鎖循環系で飼育する「閉鎖循環加温区」および加温処理せず、かけ流し状態で経過観察する「かけ流し無加温区」を設けた。各区とも0.3トンのFRP角型水槽（水量0.2トン）にアユを120尾収容した。閉鎖循環系は、市販の60cm水槽用上部濾過槽および水中ポンプを2セット設置して循環させた。加温処理の行程は、各区に分養後直ちに加温処理を開始し、「23℃3日間→18℃(通常水温)3日間→28℃3日間」とした。目的の水温へは半日程度かけて到達するよう調整した。

試験②：漁獲直後の冷水病自然発病アユの閉鎖循環系飼育下での加温処理

より養殖現場に近い条件とするため、漁獲直後のアユを用いて閉鎖循環系飼育下での加温処理を行った。

【供試魚】漁獲直後の冷水病を自然発病した琵琶湖産アユ（平均体重3.9g）を用いた。供試魚は漁獲後、地下水で1週間馴致した後、直ちに供試した。

【試験区】試験①と同様に「かけ流し加温区」、「閉鎖循環加温区」および「かけ流し無加温区」を設けた。各区とも1トンの角型水槽（水量0.75トン）にアユを1.2kg収容した。閉鎖循環系は、市販の観賞魚用ろ過フィルターを詰めた60cm水槽を濾過槽として飼育水槽の上部に設置し、水中ポンプで循環さ

せた。加温処理の行程は、各区に分養後直ちに加温処理を開始し、「23℃3日間→18℃(通常水温)3日間→28℃3日間」とした。目的の水温へは半日程度かけて到達するよう調整した。

試験③：閉鎖循環系飼育下で加温処理したアユの耐病性の付与状況の確認

閉鎖循環系飼育下で加温処理したアユを攻撃試験により再度冷水病に感染させ、冷水病に対する耐病性の付与状況について確認を行った。

【供試魚】試験①および試験②の加温処理21日後のアユを用いた。加温処理後はいずれの区も通常のかげ流し飼育をした。また、対照区として漁獲後すぐに加温処理した後、地下水で養成した冷水病未経験の琵琶湖産アユを用いた。

【攻撃方法】冷水病菌PH0424株を1/2CGY液体培地で24時間振とう培養後、同培地で21時間拡大培養して培養菌液とした。培養菌液を地下水で4倍希釈して供試魚を60分間浸漬した。浸漬に用いた菌液の菌濃度は、 1.3×10^8 CFU/mlであった。

【試験区】試験①②の各区および対照（冷水病未経験アユ）区を設けた。供試魚は冷水病菌攻撃後、60cm水槽（水量55L）に21～23尾収容し15日間経過観察した。

【結果および考察】

試験①：供試魚は病魚飼育排水による人為感染の10日後に下アゴの出欠および欠損がみられ冷水病の発病を確認したため、この時点で各試験区に分けて供試した。また、人為感染から供試までの期間における累積死亡率は2.8%で、発病確認時の死亡魚の腎臓からは冷水病菌が分離された。加温処理の開始から終了までの期間の各区の生残率を図1に示す。「かけ流し加温区」、「閉鎖循環加温区」および「かけ流し無加温区」の生残率はそれぞれ79.2%、96.7%および69.0%であった。「閉鎖循環加温区」では期間中の死亡は4尾に留まり、加温処理により冷水病による死亡が抑えられた。「かけ流し加温区」では28℃加温中に22尾のまとまった死亡があり、生残率が低下した。死亡魚からは冷水病菌は分離されなかったが、アゴの欠損および黄色の粘液の付着がみられ、患部組織をウェットマウントで検鏡したところ、円柱状に集合した菌体が確認されたことから、カラムナリス病による死亡であると判断した。なお、「閉鎖循環加温区」についてもカラムナリス病の兆候がみられたため、28℃加温については、すべての試験区でかけ流し状態とした。一方、「かけ流し無加温区」は期間中の飼育水温は18.0～18.9℃で、冷水病による死亡が継続していた。カラムナリス病による死亡を除けば「かけ流し加温区」の生残率は、97.5%（冷水病による死亡は3尾）となることから、冷水病の加温治療としては、「かけ流し加温区」、「閉鎖循環加温区」

とも、加温処理をしない「かけ流し無加温区」に対して有意 (χ^2 検定、 $P < 0.001$) に治療効果が有り、また2つの加温区の間には差はないと考えられた。試験②：供試魚は、漁獲時にすでにアゴの発赤等の症状がみられたが、漁獲時のスレ等による影響を考慮して、地下水で1週間馴致後、各試験区に分けて供試した。馴致期間中の死亡魚から冷水病菌が分離された。各試験区に分けた後、直ちに加温処理を開始したところ、23℃加温2日目から死亡尾数が増加し、試験開始6日目までに「閉鎖循環加温区」の供試魚がほぼ全滅した(図2)。死亡魚の多くで腎臓からエドワジエラ・イクタルリが分離されたことから、加温中の死亡はエドワジエラ・イクタルリ感染症によるものと判断した。「閉鎖循環加温区」が全滅状態となったため、以降の加温処理は行わず試験中止とした。一方、期間中の「かけ流し加温区」の生残率は83.1%と比較的高く、加温処理中にエドワジエラ・イクタルリ感染症が発症したものの、その影響は一部に留まったと考えられる。なお、加温処理を行わない「かけ流し無加温区」の期間中の生残率は56.2%であった。

試験③：試験②については加温処理期間中に試験中止としたため、試験①の供試魚のみ加温処理終了21日後の耐病性の付与状況について確認した。冷水病菌による浸漬攻撃後の生残率を図3に示す。試験終了時の生残率は、対照区の「冷水病未経験アユ」が33.3%であるのに対して、「閉鎖循環加温アユ」、「かけ流し加温アユ」では71.4%、81.0%と有意に高くなった

(Fisherの直接確率計算法、 $P < 0.02$ 、 $P < 0.005$)。一方、閉鎖循環飼育とかかけ流し飼育の間には差は見られなかった。また、治療を行わなかった「かけ流し無加温アユ」は95.7%であった。なお、加温処理開始から終了21日後(攻撃試験)までの死亡率は、「閉鎖循環加温アユ」17.5%(すべてカラムナリス病による死亡)、「かけ流し加温アユ」27.5%(カラムナリス病25.0%、冷水病2.5%)および「かけ流し無加温アユ」46.5%であった。

以上の結果から、まず、閉鎖循環系飼育下での加温処理について、漁獲直後等、天然水域のアユでは、冷水病以外にエドワジエラ・イクタルリ感染症等に混合感染している可能性があり、そのようなアユに対して閉鎖循環系飼育下で加温処理を行った場合、高水温時に病勢の強くなる冷水病以外の他の疾病を発症し、死亡するリスクが高くなるという問題点が明らかになった。試験①では、より実際の発病状況に近い条件とするため、培養菌液ではなく、冷水病を発病しているアユの飼育排水を利用して人為感染させた。そのため、感染から発症まで10日程度かかり、その後、だらだらとした死亡が2週間程度続き、累積死亡率が46.5%と半数近くとなり、養殖場での発病に近い状況が再現できた。しかし、純粋な培養菌での攻撃ではなかったため、他の病原菌が混入し、加温時にカラムナリス病が発症したものと考えられる。同様に試験②においても、現場での加温処理を想定して、漁獲後間もないアユを用いたが、冷水病菌以外の病原菌の感染により、閉鎖循環系で加温処理する

ことで、かえって死亡を増やす結果となった。よって、実際に養殖現場で閉鎖循環系飼育下での加温処理を行う場合には、処理するアユの保菌状況を予め検査し、混合感染の有無を確認する必要があることがわかった。一方で、耐病性の付与状況については、加温処理終了21日後の時点で、通常のかけ流し加温処理との差はなかった。また、カラムナリス病の発生はあったものの、加温処理以降の生残率についても通常のかけ流し加温と差はなかったことから、閉鎖循環系飼育下での加温処理については、加温するアユの保菌状態に配慮すれば、通常のかけ流し加温と同等の効果を得ながらランニングコストを削減できる可能性があるとして示唆された。今回は小規模の水槽での試験であったことから、本法の技術を確立するには、今後より実践的な規模での閉鎖循環系飼育の検証が必要である。

竹上健太郎(滋賀県水産試験場)

平成29年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止に係る 技術開発等

①アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発 (増養殖研究所)

試験 1：フロルフェニコール投与によるエドワジエラ・イクタルリの被害軽減と加温飼育による冷水病に対する抗病性付与の検討

【目的】

前年度まで得られた成果及び問題点として、SPFの湖産アユ種苗を用いて、閉鎖循環飼育下で人為的に冷水病菌を感染させた後、加温処理を施すと冷水病に対し耐病性を付与することができたが、琵琶湖で漁獲された天然種苗を用いた場合には加温期間中のエドワジエラ・イクタルリ等の冷水病以外による被害をいかに軽減するかが重要であることが示された。そこで本年度は、加温期間にエドワジエラ・イクタルリを感染させ、さらに加温期間中の5日間にフロルフェニコールを投薬し、エドワジエラ・イクタルリによる被害を軽減し、かつ冷水病への耐病性を付与できるかどうか検証した。

閉鎖循環飼育下における加温処理試験

【方法】

供試魚：琵琶湖産アユ(平均体重 3.2g) 琵琶湖のエリで捕獲され、1g未滿時に加温飼育し冷水病菌を除菌したもの。

試験区及び加温プログラム：

冷水病＋昇温区：冷水病菌を接種した魚を同居感染させ、4日後に20℃へ加温し、その翌日25℃へ加温し、さらにその翌日から28℃で3日間加温飼育し、28℃に昇温した3日目の夕方に18℃に戻した。

冷水病＋イクタルリ＋昇温区（イクタルリ感染の陽性対照）：冷水病菌を接種した魚を同居感染させ、4日後に20℃へ加温すると同時にエドワジエラ・イクタルリを浸漬感染させ、その翌日に25℃へ加温し、さらにその翌日から28℃に加温し継続飼育した。

冷水病＋イクタルリ＋昇温＋フロルフェニコール投与区：

冷水病菌を接種した魚を同居感染させ、4日後に20℃へ加温すると同時に

エドワジエラ・イクタルリを浸漬感染させ、その 4 時間後からフロルフェニコールの投与を開始した。その翌日に 25℃へ加温し、さらにその翌日から 28℃で 3 日間加温飼育し、28℃に昇温した 3 日目の夕方に 18℃に戻した。フロルフェニコールの投与は水温 20℃の時から 28℃までの 5 日間行った。

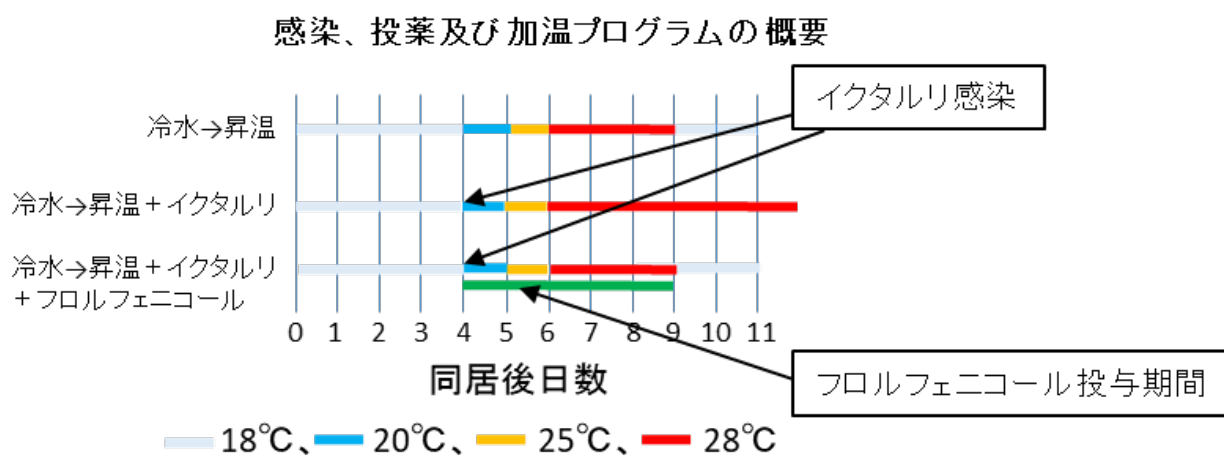
陽性対照（冷水病のみ感染）区：

冷水病菌を接種した魚を同居感染させ、加温を行わず継続飼育した。

陰性対照区：

非感染（無処理区）

下記に本試験の感染、投薬及び加温プログラムの概要を示す。



攻撃方法：

冷水病菌感染方法：1/2CGY 培地にて 24 時間振とう培養した冷水病菌 SG150804株（琵琶湖産アユより分離、以下 SG08 株と省略）の菌液を 1.8×10^7 CFU/尾で腹腔内（IP）接種した。

エドワジエラ・イクタルリ感染方法：LB 培地にて 24時間振とう培養したエドワジエラ・イクタルリ PH-0744 株の菌液 5.5×10^7 CFU/mL に供試魚を30分間浸漬し、供試魚のみ水槽に戻した。

フロルフェニコール投与方法：

フロルフェニコールとしてアクアフェン L（MSD Animal Health 製）を用いた。フロルフェニコールを10mg/kg 魚体重になるように飼料中（アユテック、マリンテック（株））に添加し、5日間投与した。飼料は1日に魚

体重の0.5%となるように与えた。

供試魚からの菌分離：

冷水病菌については 1/2CGY 寒天培地を用いて、腎臓と潰瘍病変が観察された場合にはその病変部位から冷水病菌の分離し、16℃で培養した。エドワジエラ・イクタルリについては SS 寒天培地を用いて、腎臓から分離し、25℃で培養した。

供試魚からの冷水病菌及びエドワジエラ・イクタルリ DNA の抽出及び PCR 法：

供試魚の腎臓から Gentra Puregene Tissue Kit (キアゲン) により DNA を抽出し、冷水病菌については吉浦ら (2006) に、エドワジエラ・イクタルリについては Sakai et al. (2009) に従い、それぞれ PCR を実施した。

飼育方法：

200L容量円形水槽に感染源として冷水病菌を腹腔内接種したアユ（以下、IP 接種魚）を 5 尾（ヒレカットにより同居魚と識別）と非感染魚を45尾收容し飼育した。その後、上記に記載したように、試験区ごとに飼育水温の昇温やエドワジエラ・イクタルリ感染及びフロルフエニコール投与を行い、28日間死亡を観察した。同居感染28日後に各区30尾については、以下に記載する再感染試験に供試した。

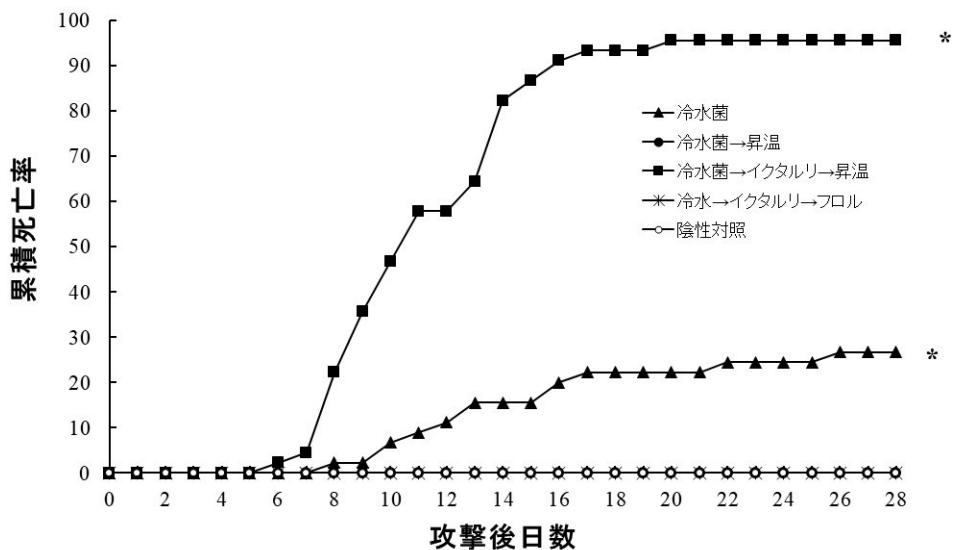
循環飼育方法として円形水槽に12L 容量の観賞魚用ろ過フィルター（150～400L水槽用）を取り付け循環飼育した。なお、いずれの試験区においても飛沫等による飼育水量の低下を防ぐため、150mL/時で井水を注入した。なお、陰性対照区は無処理とし、45尾を收容して感染区と同様に飼育した。

いずれの試験区も加温時以外の飼育水温はおよそ 18℃で維持した。

【結果及び考察】

いずれの試験区のIP接種魚は接種3日後までに4～5尾が死亡し、いずれの個体からも冷水病菌-DNAが検出された。接種1日後の午後までにIP接種魚の死亡率が80%に達したことから、同居 4日後の午後から飼育水の昇温を開始した（感染源である IP 接種魚が 80%以上死亡した後3日後に同居魚へ冷水病菌の感染が起こっていることは一昨年度に検証済み。）

試験開始後の同居魚の累積死亡率を下記に示す。



* 陰性対照区に比べ有意に高い($P < 0.05$, χ^2 二乗検定)

28日間の試験期間中、冷水＋昇温区、冷水＋イクタルリ＋昇温区、冷水＋イクタルリ＋フロル区及び陽性対照区の累積死亡率はそれぞれ 0%、96%、0%及び 27%であり、冷水病菌感染の陽性対照区及び冷水＋イクタルリ＋昇温区の値は陰性対照区や冷水＋昇温区及び冷水＋イクタルリ＋フロル区に比べ有意 (χ^2 二乗検定) に高かった。

冷水＋昇温区のすべての死亡魚からは冷水病菌が腎臓または潰瘍病変部より分離され、腎臓から冷水病菌-DNA が PCR 法により検出された。生残魚からも33尾中1尾から冷水病菌-DNA が検出された。

さらに冷水＋イクタルリ＋昇温区の死亡魚からはエドワジエラ・イクタルリが腎臓より分離され、腎臓からエドワジエラ・イクタルリ-DNA が PCR 法により検出された。冷水病菌のみ感染させた陽性対照区では同居開始6日後より冷水病による死亡が観察され、ダラダラと試験終了時まで死亡が続いた。死亡個体からは高率(33尾/35尾)に冷水病菌が検出され、生残魚からも60尾中7尾から検出された。陰性対照区での死亡は全く観察されず、生残魚からも冷水病菌は検出されなかった。

これら結果からアユに対する冷水病菌及びエドワジエラ・イクタルリの人為的感染試験は成功したことが示された。また、閉鎖循環飼育下において28℃へ昇温することにより冷水病菌の感染を受けたアユの死亡を抑えられることを昨年と同様確認できた。さらに20℃時にエドワジエラ・イクタルリの感染を受け、その後飼育水温が28℃に上昇した場合でも、昇温期間中の5日間にフロルフェニコールを用法用量通り与えることによりエドワジエラ・イクタルリの発生を抑えることも示唆された。

2) 再感染試験

【方法】

試験区：

冷水病＋昇温区

冷水病＋イクタルリ感染＋昇温＋フロルフェニコール投与区陽性対照（未感染魚□冷水病菌攻撃）区

陰性対照（未感染魚□非攻撃）区

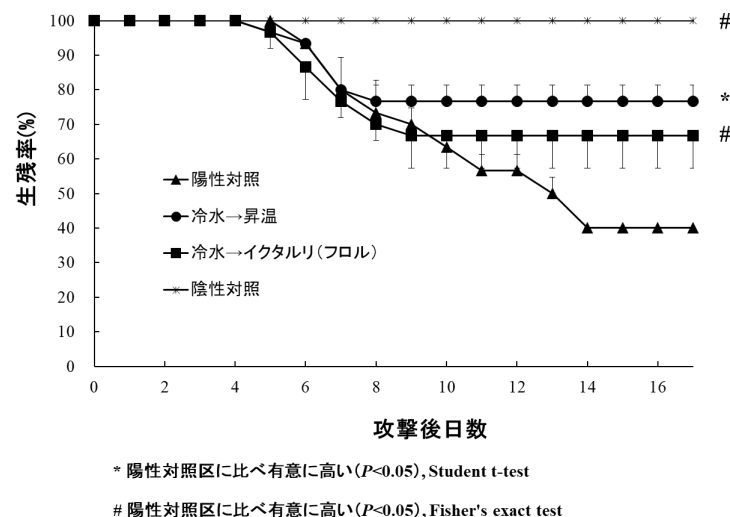
各区 30尾を1水槽に 15尾ずつ収容し陰性対照区以外はそれぞれ2水槽ずつ供した。陰性対照区は1水槽を用いた。

攻撃方法：

浸漬法：各区の供試魚を 1/2CGY にて振とう培養した冷水病菌SG08 株の菌液 2.0×10^7 CFU/mL に1時間浸漬した。

【結果及び考察】

各加温飼育区の生残魚に対する浸漬攻撃後の後の生残率を下記に示す。



浸漬法による冷水病菌再攻撃試験における冷水病＋昇温区、冷水病＋イクタルリ感染＋昇温＋フロルフェニコール投与区、陽性対照区及び陰性対照区（非感染区）の生残率はそれぞれ 77%、67%、40%及び 100%であった。Studentのt検定または Fisher の正確検定による有意差統計の結果、冷水病＋昇温区及び冷水病＋イクタルリ感染＋昇温＋フロルフェニコール投与区の生残率は陽性対照区に比べ有意に高い値を示した。また、加温処理による死亡軽減の有効率（ $(1 - \text{加温処理区の死亡率} / \text{陰性対照区の死亡率}) \times 100$ ）は冷水病＋昇温区が

61%であり、冷水病+イクタルリ感染+昇温+フロルフェニコール投与区は44%であった。

全ての試験区の全ての死亡個体から冷水病菌が分離され、腎臓及び鰓から冷水病菌-DNAが検出された。いずれの試験区でも1割程度(全体で5/55)の生残魚から冷水菌は分離されないものの、冷水病菌-DNAが検出されたが、検出率に対する試験区間の明確な相違は認められなかった。

冷水病+イクタルリ感染+昇温+フロルフェニコール投与区の冷水病菌再感染による死亡魚(冷水病発症魚)において10尾中2尾の腎臓からイクタルリ-DNAが検出された(菌分離はネガ)。これはフロルフェニコール投与区によりイクタルリ症の発病は抑えられるものの、冷水病菌感染により体内に残存していたエドワジエラ・イクタルリ菌が再増殖したことを示唆しているのではないかと推察された。したがって、エドワジエラ・イクタルリを保菌しているアユの加温処理する際、フロルフェニコールを投与することによりその発症は抑えられるものの、河川に放流後冷水病菌に感染すると一部の魚はエドワジエラ・イクタルリ菌を排出する危険性があるのではないかと推察された。なお、当該試験区の生残魚からはエドワジエラ・イクタルリは分離されず、イクタルリ-DNAも検出されなかった。

今回の結果より、閉鎖循環系飼育下において冷水病菌に感染したアユに加温処理を施すことにより、アユは冷水病に対し耐病性を有することが再確認された。同様に、フロルフェニコール投与区でもある程度の耐病性を示すことが分かった。しかし、冷水病再感染後の死亡魚の一部からエドワジエラ・イクタルリ-DNAが検出されたことから、イクタルリ症の蔓延防止の観点から加温処理に用いる湖アユはエドワジエラ・イクタルリを保菌していない状態、もしくは保菌量が少ない時期の魚を用いることが重要であると考えられた。

試験 2：エドワジエラ・イクタルリによる被害が少ない水温帯におけるフロルフェニコール投薬後のアユに対する冷水病の加温処理効果の検討

【目的】

これまでの滋賀県による疫学調査により琵琶湖で採捕される湖アユはイクタルリによる被害が少ない水温帯である12月までエドワジエラ・イクタルリを保菌していることが示唆されている。そこで、エドワジエラ・イクタルリを感染させた後、その被害が少ない水温帯でフロルフェニコールを投薬し、エドワジエラ・イクタルリを抑えられるか、またその魚が冷水病に感染し加温処理された際の冷水病発症への効果とイクタルリ症の発症への影響を調べた。

【方法】

供試魚：試験1と同一ロットの琵琶湖産アユ(平均体重 3.2g) を用いた。

試験区：

イクタルリ（20℃陽性対照）区：

水温 20℃でアユにエドワジエラ・イクタルリを浸漬感染させ死亡を観察した。

イクタルリ（20℃）→フロル投与→冷水病→昇温区：

水温 20℃でアユにエドワジエラ・イクタルリを浸漬感染させ、その5日後からフロルフェニコールの投与を5日間行った。さらにその16日後に（フロルフェニコールの休薬期間は14日間）冷水病菌を感染させ、その4時間後に25℃へ加温し、さらに翌日から28℃で3日間加温飼育し、28℃に昇温した3日目の夕方に18℃に戻した。

冷水病陽性対照区：

冷水病菌の浸漬感染のみ。

28℃－イクタルリ（陽性対照）区：

水温 28℃でアユにエドワジエラ・イクタルリを浸漬感染させ死亡を観察した。

陰性対照区：非

感染（28℃無処理区）

攻撃方法：

エドワジエラ・イクタルリ感染方法：LB 培地にて24時間振とう培養したエドワジエラ・イクタルリ菌 PH-0744 株の菌液 3.2×10^7 CFU/mLに供試魚を30分間浸漬した。冷水病菌感染方法：1/2CGY 培地にて24時間振とう培養した冷

水病菌 SG150804 株（琵琶湖産アユより分離、以下SG08株と省略）の菌液を 2.0×10^7 CFU/mL に供試魚を 1 時間浸漬した。

フロルフェニコール投与方法：

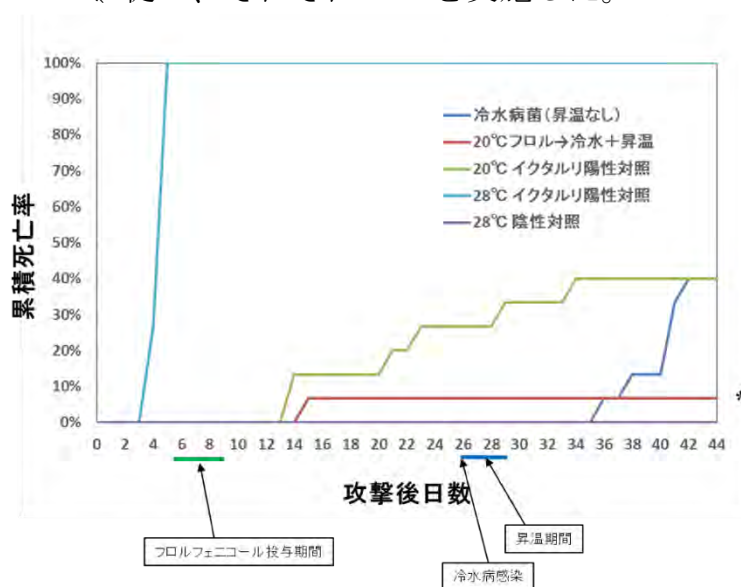
フロルフェニコールとしてアクアフェン L (MSD Animal Health 製) を用いた。フロルフェニコールを 10mg/kg 魚体重になるように飼料中（アユテック、マリンテック（株））に添加し、5 日間投与した。飼料は 1 日に魚体重の 0.5% となるように与えた。

供試魚からの菌分離：

エドワジエラ・イクタルリについて SS 寒天培地を用いて、腎臓から菌分離を行い、25°C で培養した。

供試魚からの冷水病菌及びエドワジエラ・イクタルリ DNA の抽出及び PCR 法：

供試魚の腎臓から Gentra Puregene Tissue Kit (キアゲン) により DNA を抽出し、冷水病菌については吉浦ら (2006) に、エドワジエラ・イクタルリについては Sakai et al. に従い、それぞれ PCR を実施した。



* 冷水病菌陽性対照(昇温なし)区に比べ有意に低い($P < 0.05$), Fisher's exact test

飼育期間：44 日間

28°Cイクタルリ陽性対照区の累積死亡率は攻撃 5 日後に 100%に達した。また、44 日間の 20°Cイクタルリ陽性対照区の死亡率は 40%であった。一

方、水温20℃で攻撃後5日後からフロルフェニコールを投与された試験区では累積死亡率は7%であり、その値は20℃イクタルリ陽性対照区に比べ有意に低かった。全ての攻撃区の死亡魚の腎臓からエドワジエラ・イクタルリが分離され、エドワジエラ・イクタルリ-DNA が検出された。

投薬後16日後に冷水病菌を浸漬感染させ、4時間後に加温処理を施しその後18日間死亡を観察したが、死亡は起こらず、エドワジエラ・イクタルリ感染後20℃においてフロルフェニコール投薬した場合でも、冷水病に対する加温処理は有効であると考えられた。冷水病陽性対照区（イクタルリ非感染、フロルフェニコール投薬無し、冷水菌感染後昇温せず）の累積死亡率は40%であり、全ての死亡魚からPCR法により冷水病菌-DNA が検出された。試験終了時（イクタルリ攻撃時から44日後、冷水病菌攻撃から18日後）のいずれの試験区でも生残魚からはエドワジエラ・イクタルリ及び冷水病菌のいずれについても菌分離されず DNA も検出されなかった。

この結果から、水温20℃でもフロルフェニコール投与はイクタルリ症に有効であった。さらに、その後冷水病に感染した場合でも、加温処理により冷水病の発症を抑えることが出来、本実験においてはイクタルリ症の再発もなかった。したがって、エドワジエラ・イクタルリを保菌している湖アユに対してはエドワジエラ・イクタルリによる被害が少ない水温帯においてフロルフェニコール投薬し、さらに加温処理を行うことが有効である可能性を示唆した。しかし、試験1の結果から示唆されるように、加温処理されたアユが河川に放流後、冷水病再感染を受けた際にエドワジエラ・イクタルリを再発する可能性が残されていることから、本試験の様な投薬及び加温処理を行う際にもこの点に十分留意する必要があると考えられた。

伊東尚史・坂井貴光・山崎雅俊

(増養殖研究所魚病研究センター病原体グループ)

②冷水病自然発病魚に対する閉鎖循環飼育による抗病性付与技術の検証 (滋賀県水産試験場)

【目的】

冷水病の再発を防ぎ抗病性を付与するため、閉鎖循環系の飼育水槽を活用した効率的な加温処理技術の開発を行う。

【材料及び方法】

アユの閉鎖循環飼育下での加温処理

アユ養魚池と形状が同じでスケールが約 1/15 の池を用いて琵琶湖で漁獲されたアユを収容して閉鎖循環飼育下での加温処理を行った。

【供試魚】6月9日に琵琶湖のエリで漁獲されたアユ（平均体重 1.5g）を用いた。

【試験区】試験区は、「閉鎖循環加温区」「かけ流し加温区」「かけ流し無加温区」を設けた。「閉鎖循環加温区」および「かけ流し加温区」は7トン八角形水槽にアユ（平均体重 1.5g）をそれぞれ 5 kgずつ収容した。「かけ流し無加温区」は1トンの角型水槽に 1.5kg 収容した。閉鎖循環加温区は、7トン八角形水槽に設置した閉鎖循環飼育システムを用いた。その濾過槽として 500L FRP 水槽を設置し、水中ポンプで循環させた。冷水病を治療するための加温処理の行程は、「25℃1日間→28℃3日間」とした。目的の水温へは半日程度かけて到達するよう調整した。通常の飼育水温は 18℃とし、飼育水における窒素化合物濃度（NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N）を測定するために定期的に飼育水を採水した。また、冷水病菌の保菌状況を PCR 法で漁獲時には 60 尾、加温終了 3 日後および感染試験時に各区 30 尾ずつ調べた。

閉鎖循環飼育下で加温処理したアユの抗病性の付与状況の確認

閉鎖循環系飼育下で加温処理したアユを感染試験により再度冷水病に感染させて冷水病に対する抗病性の付与状況を調べた。

【供試魚】加温処理 21 日後の各区のアユを用いた。また、対照区として冷水病未経験の琵琶湖産アユを用いた。

【感染方法】冷水病菌 SG150804 株（および（参考）PH0424 株）をそれぞれ 1/2CGY 液体培地で 15℃で 24 時間振とう培養後、同培地で 21 時間拡大培養した菌液を地下水で希釈して供試魚を 30 分間浸漬して行った。供試魚は冷水病菌感染後、60 cm水槽（水量 50L）に 25 尾×2 水槽に収容して 21 日間経過観察した。冷水病に対する抗病性を評価するため、感染 21 日後の各試験区の

累積死亡率を冷水病未経験アユと比較し、有効率（RPS：1－（試験区死亡率/未経験アユ死亡率））を求めた。

【結果】

アユの閉鎖循環飼育下での加温処理

「閉鎖循環加温区」では、収容した2日後に冷水病様症状を呈した死亡魚が出現し、3日目には累積死亡率が4%に達した（図1）。そのため、25℃に水温を上げ、翌日からは28℃で3日間、加温処理を行った。また、加温終了21日後にエドワジエラ症が発病したため、フロルフェニコールを経口投与して治療した。

「かけ流し加温区」では収容した2日後に冷水病様症状を呈した死亡魚が少数出現したが、その後、治療を行っていないにもかかわらず、死亡が自然終息した。その後、収容してから15日を経過しても冷水病による死亡が起こらないため、感染実験に備えて同様のスケジュールで28℃の加温処理を行った。28℃加温2日目にカラムナリス病を発病したため加温を中止し、フロルフェニコールを経口投与して治療した（図1）。「かけ流し無加温区」では、冷水病を含めて何れの魚病も発生しなかった。

閉鎖循環飼育システムを用いた飼育は、6/9～6/17に行っていたが、加温処理飼育期間を含め、システムに由来すると考えられる飼育環境の悪化等による死亡やアユの行動に異常は確認されなかった。また、水質分析の結果、かけ流し加温区と比較してNH₄-N、NO₃-N濃度は高いものの水産用水基準に照らして飼育水として問題はない数値であった（図2）。

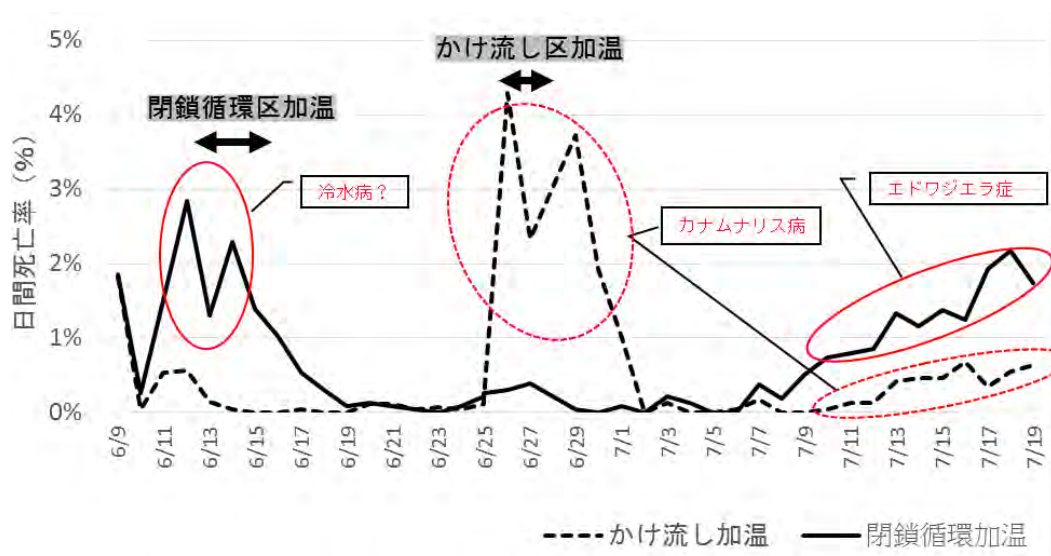


図1. 飼育試験における閉鎖循環加温区とかけ流し加温区の日間死亡率

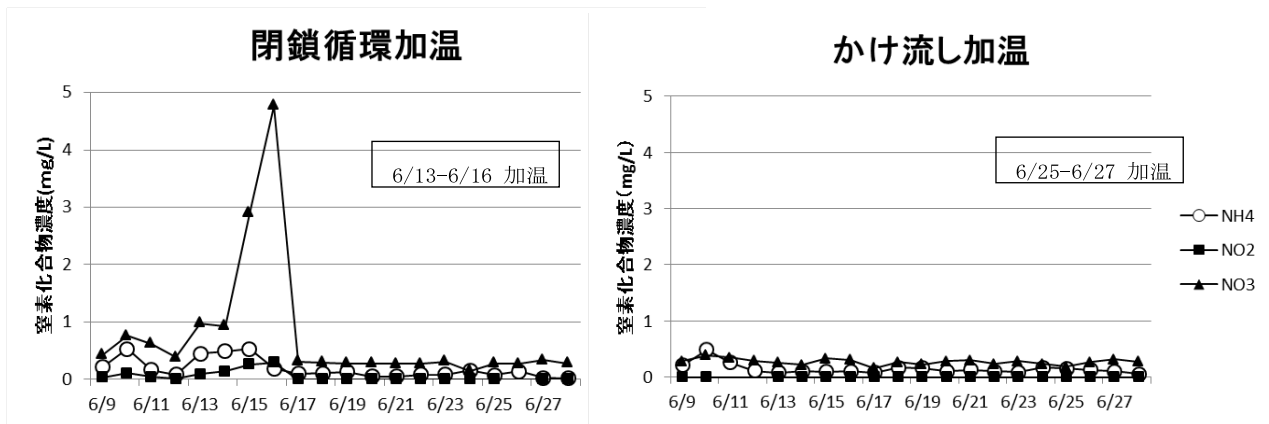


図2. 飼育試験における閉鎖循環加温区とかけ流し加温区の水質分析結果
 (参考) 水産用水基準 硝酸態窒素 9mg/L 以下、亜硝酸態窒素 0.03mg/L 以下、全窒素 0.2mg/L 以下

閉鎖循環飼育下で加温処理したアユの抗病性の付与状況の確認

図1に示すとおり、「閉鎖循環加温区」と「かけ流し加温区」の加温処理の実施時期が異なったため、冷水病に対する抗病性を評価するための感染実験を2回行った。試験終了時の死亡率は、対照区の「冷水病未経験」が48.0%および34.5%に対して、「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」では53.2%および45.7%とともに対照区より高く、また、治療を行わなかった「かけ流し無加温区」は「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」と比べ死亡率に違いは認められず、閉鎖循環飼育による冷水病に対する抗病性の付与は確認されなかった。なお、表の死亡数には含めていないが「閉鎖循環加温区」では15個体、「かけ流し加温区」では3個体がエドワジエラ・イクタルリ感染症の症状を呈して死亡した。また、PH0424株の感染実験結果はエドワジエラ・イクタルリ感染症が試験結果に大きく影響したと考えられたため、文末に(参考)として記載した。

表1 感染試験結果(SG150804 株)

試験区	生残尾数	死亡尾数	死亡率	RPS
鎖循環加温	22	25	53.2%	-11%
かけ流し加温	—	—	—	—
かけ流し無加温	13	12	48.0%	0%
control(未経験)	26	24	48.0%	—
閉鎖循環加温	—	—	—	—
かけ流し加温	25	21	45.7%	-32%
かけ流し無加温	20	21	51.2%	-48%
control(未経験)	32	17	34.7%	—

※ 感染試験攻撃菌濃度: (上段) 6.1×10^6 、(下段) 2.3×10^7 CFU/mL

表2 冷水病菌およびエドワジエラ・イクタルリ菌の保菌検査結果

試験区	冷水病菌 鰓	冷水病菌 腎臓	エドワジエラ菌
漁獲時	0/60	—	0/60
28℃終了 3 日後 閉鎖循環加温	1/30	0/30	—
28℃終了 3 日後 かけ流し加温	1/30	0/30	—
(収容 20 日後) かけ流し無加温	0/30	0/30	—
28℃終了 21 日後 閉鎖循環加温	0/30	1/30	—
28℃終了 21 日後 かけ流し加温	0/30	0/30	—
(感染時) かけ流し無加温	0/30	0/30	—

【考察】

今回の琵琶湖産アユ漁獲群においては「かけ流し無加温区」において、冷水病が発病しなかった。また、「かけ流し加温区」においても収容した2日後に少数の冷水病用症状を呈した死亡魚が認められたが、その後大量死を起こすことなく終息した。我々は琵琶湖産アユの飼育試験を多数行ってきたが、これまでに投薬や加温処理などの冷水病治療を行わなかった場合は、必ず冷水病が発病しており、これは初めての事例である。発病しなかった原因は不明である。

閉鎖循環系飼育下での加温処理について、漁獲直後等、天然水域のアユでは、冷水病菌以外にエドワジエラ・イクタルリ等をともに保菌している可能性があり、そのような魚群に加温処理を行った場合、昨年度の試験ではエドワジエラ・イクタルリ感染症でほぼ全滅する事例も経験した。そこで、本試験

では漁獲時の保菌検査でエドワジエラ・イクタルリ保菌陰性の魚群を用いた。それにも関わらず、加温を行った試験区ではエドワジエラ・イクタルリ感染症が発生した。これは本漁獲アユがエドワジエラ・イクタルリを検出限界以下で保菌していたことを示唆している。また、他の高水温飼育時に発生しやすい魚病として、昨年度に引き続いて「かけ流し加温区」を主体に「閉鎖循環加温区」でもカラムナリス病が発病した。このように高水温時に病勢の強くなる冷水病以外の他の疾病による死亡リスクの問題が改めて明らかになった。加温を行った試験区ではその後もエドワジエラの発病を繰り返したのに対して、加温を行わなかった試験区では発病しなかった。このことはエドワジエラ・イクタルリ保菌群に加温を行うとエドワジエラ症の発病・蔓延を促すことを示唆している。したがって、今後の閉鎖循環加温試験では、加温してもエドワジエラ・イクタルリの発病のない時期（1月～5月）のアユで試験を行う必要があると考えられた。

「閉鎖循環加温区」では「かけ流し加温区」と比較して、6月10日から6月13日のアユの冷水病と思われる死亡数が著しく多かった。これは、事業規模を想定した水槽においても閉鎖循環飼育を行うことにより、飼育水中の病原菌の濃度が高くなり、かけ流し飼育よりも冷水病をより蔓延させることができる可能性を示唆している。したがって、次年度以降に1月～5月に漁獲される琵琶湖産アユを用いて再度試験を行って閉鎖循環飼育による抗病性付与技術を検証する必要があると考えられた。

(参考)冷水病菌 PH0424 株の感染実験結果

試験区	生残尾数	死亡尾数	死亡率	RPS
閉鎖循環加温	12	6	33.3%	-39%
かけ流し加温	—	—	—	—
かけ流し無加温	57	18	24.0%	0%
control(未経験)	35	11	23.9%	—
閉鎖循環加温	—	—	—	—
かけ流し加温	28	17	37.8%	-110%
かけ流し無加温	40	11	21.6%	-20%
control(未経験)	41	9	18.0%	—

※ 感染試験攻撃菌濃度: (上段) 5.6×10^7 、(下段) 1.4×10^8 CFU/mL

滋賀県水産試験場

平成 30 年度水産動物疾病の診断・予防・まん延防止にかかる技術開発等

アユの冷水病に関する効率的な加温処理技術の開発

(増養殖研究所・滋賀県水産試験場)

冷水病の再発を防ぎ耐病性を付与するため、閉鎖循環系を活用した効率的な加温処理技術の開発を行った。まず、冷水病に対するアユの生体防御には抗体が関与することから、加温処理と耐病性付与の関連性を検討するための指標として抗体価に着目し、「冷水病に対する抗体価測定法の開発」に取り組んだ。そして、「冷水病自然発病魚に対する閉鎖循環飼育による抗病性付与技術の検証」を行った。

1) 冷水病に対する抗体価測定方法の開発

冷水病感染に対するアユの生体防御には、原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* に対する抗体が関与することが報告されている¹⁾。従って、本病の防除研究の進展には、有用な抗体価測定技術の開発が必要である。これまでにアユの冷水病に対する抗体価測定方法としては、ELISA 法^{2,3)}や受身赤血球凝集反応法等が報告されており、*F. psychrophilum* の菌体成分を抗原として用いる。本菌は、複数種のプロテアーゼを有することが知られており、これらの活性による菌体成分の自己消化が、本菌の抗原に関する研究に支障を来すことがある。そこで本課題では、この菌体成分の自己消化を簡便に不活化する条件を検討した。さらに、至適化した不活化条件で菌体破碎液を調製し、これを抗原として用いた ELISA 法の開発を行った。

【材料及び方法】

供試菌株及び培養

供試菌株には、*F. psychrophilum* SG150804 株を用いた。1/2 CGY 培地で液体培養した菌体を遠心分離で回収後 PBS 中に懸濁し、再度遠心分離で菌体を回収した。この菌体を 0.1g (湿菌重量) /mL の割合で PBS 中に懸濁し、-80°C で凍結保存した。

菌体の破碎

凍結保存した菌液を水中で融解し、超音波破碎機 (Sonics vibra cell) に供した。その破碎条件は、氷冷しながら 10 秒超音波破碎を 9 回行った。超音波破碎後、破碎液を遠心分離 (10,000×g、10 分) に供し、上清画分を回収した。再度、この遠心分離を行い、得られた上清を菌体破碎液とした。

菌体破砕液の自己消化に対する不活化条件の検討

菌体破砕液に対する市販のプロテアーゼインヒビターやEDTAの添加、及び加熱処理を検討した。具体的には、以下の3条件及びこれらの併用について検討した。

- ① EDTA 添加：10%EDTA 2Na (pH7)を菌体破砕液の1/20量を添加
- ② cOmplete™ 添加：プロテアーゼインヒビターcOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail EDTAフリーの添加。添加量は、添付マニュアルにおける5~20倍量。
- ③ 加熱：菌体破砕液を40℃に2時間静置、或いは60℃、80℃、90℃、121℃に1時間静置。

各処理条件による菌体破砕液の自己消化に対する不活化効果は、処理前後の菌体破砕液のSDS-PAGEで検出される各タンパク質バンドの減少の程度から判定した。

菌体破砕液を用いたELISA法の条件検討

菌体破砕液の自己消化に対する不活化条件の検討結果を基に、ELISA法の抗原に用いた菌体破砕液は次の手順で調製した。凍結保存菌液を融解後、直ちにEDTAを添加した。この超音波破砕で得られた菌体破砕液を40℃に2時間静置した。本破砕液のタンパク質濃度をQuick Start プロテインアッセイキット (Bio-Rad) で定量後、炭酸ナトリウムバッファーでタンパク質1、2、10、20 $\mu\text{g/mL}$ となるよう希釈し、各抗原希釈液をELISAプレートへの固相化液とした。

ELISA法の条件検討に用いた血漿は、冷水病自然感染耐過アユ40尾から採取した血漿のプールを用いた。これらのアユは平成30年4月~5月に自然感染による冷水病が発生し、病勢が見られなくなった7月に採血を行った。このプールを0.5%Tween20含TBS (T-TBS) で5、10、20、40、100倍に希釈後、ELISA法に供した。ELISA法は以下の手順で行った。

- 1) 抗原固相化液を96ウェルELISAプレート (Nunc Maxisorp) の各ウェルに50 μL ずつ分注した。また、反応最後の発色に対する外部標準として、抗アユIgM・マウスモノクローナル抗体の2倍段階希釈系列 (3.125-100 ng/mL) の添加ウェルも同プレート内に設けた。これらの固相化は、4℃で一晩行った。
- 2) 固相化液を除き、100 μL のTBSで1回洗浄
- 3) 5%スキムミルク含TBSを各ウェルに100 μL 分注し、室温で1時間静置
- 4) 100 μL のT-TBSで3回洗浄

- 5) 自然感染耐過アユ血漿プールの希釈液を 50 μ L 添加し、室温で 1 時間静置。
外部標準のウェルには、T-TBS を分注
- 6) 100 μ L の T-TBS で 3 回洗浄
- 7) T-TBS で 500ng/mL に調製した抗アユ IgM・マウスモノクローナル抗体を各
ウェルに 50 μ L 分注し、室温で 1 時間静置
- 8) 100 μ L の T-TBS で 3 回洗浄
- 9) 抗マウス IgG-HRP 標識ヤギ抗体 (Bio-Rad) の 3000 倍希釈液を 50 μ L 添加
し、室温で 1 時間静置
- 10) 100 μ L の T-TBS で 3 回洗浄
- 11) ELISA POD 基質 TMB キット (ナカライテスク) を用いて発色反応。発色後、
プレートリーダーにて 450nm の吸光度を測定

【結果及び考察】

菌体破砕液の自己消化に対する不活化が認められた処理条件

先ず、EDTA 添加、cOmplete™ 添加及び 40°C 加熱処理による不活化の効果を検討した。これらの条件で調製した菌体破砕液の SDS-PAGE 像を図 1 に示した。

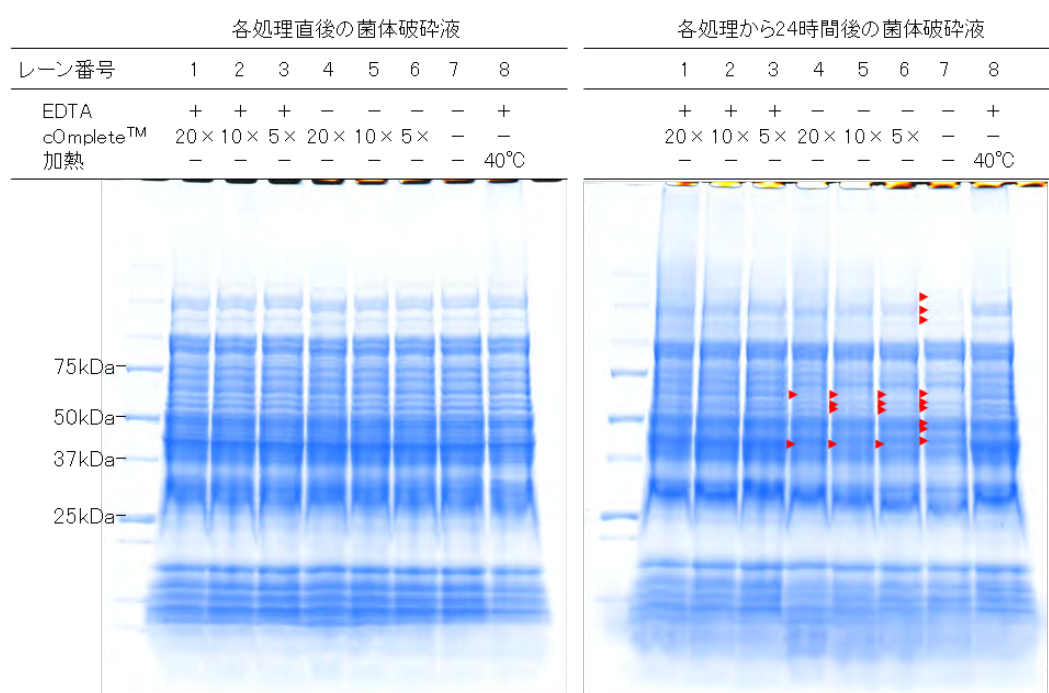


図 1. EDTA 添加、cOmplete™ 添加、40°C 加温処理を行った菌体破砕液の SDS-PAGE 像

+ : 処理有り、- : 処理無し

5×~20× : cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail EDTA フリーの濃度

▶ : 顕著な減少が認められたバンド

顕著な不活化の効果が認められたのは、EDTA の添加を行った試験区（レーン番号 1～3、8）のサンプルであった。一般的に EDTA によるプロテアーゼの不活化は可逆的であるため、次に 40°C の加熱処理の効果について検討した（図 2）。40°C 加熱だけの処理では、処理直後と処理から 2 日後の検体間のバンドパターンに差異は認められなかったが、40°C 加熱と EDTA 添加の併用処理と比較した場合、50～75kDa の間で薄くなっていたバンドがあった。これらのバンドは、加熱処理においてプロテアーゼが完全に失活前に消化を受けたと思われる。加熱処理と比較して、EDTA の添加は、プロテアーゼ不活化への即効性があると考えられた。

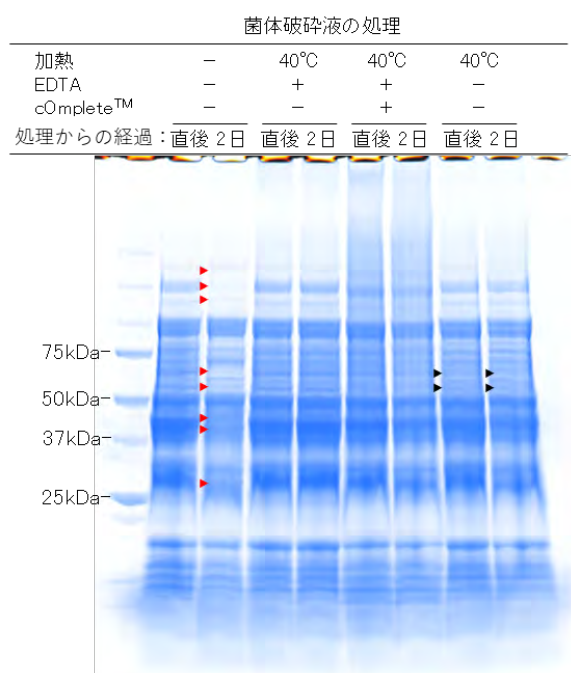


図 2. 40°C 加温処理による菌体破碎液自己消化の不活化効果の検討

+ : 処理有り、- : 処理無し

▶ : 処理直後と比較して顕著なバンドの減少が認められた位置

▶ : 加温処理と EDTA 添加の併用処理と比較して減少が認められたバンド

次に 40°C より高い加熱処理（60、80、90、121°C で各 1 時間）について検討したところ、熱凝固が発生し、高温になるに伴い凝固の程度は激しかった。熱凝固物は、遠心分離（10,000×g、5 分間）で沈殿し、上清から大部分のタンパク質が失われており、その程度は加熱時の温度に相関していた（図 3）。

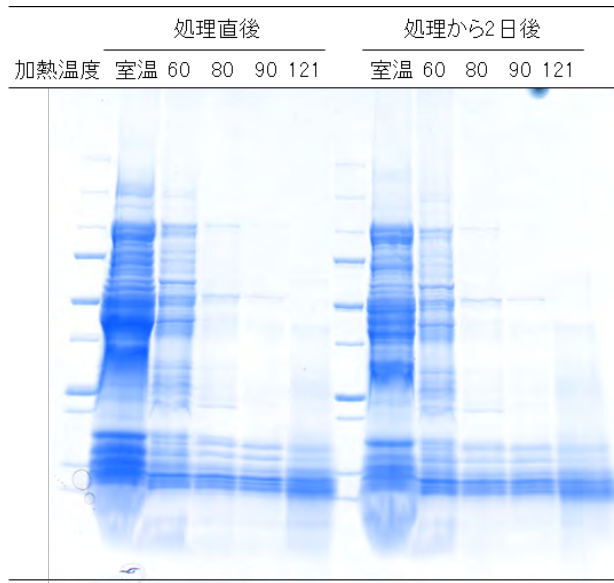


図 3. 60、80、90、121°Cで1時間加熱処理後の菌体破碎液の遠心上清

以上の結果から、菌体破碎液の自己消化に対して即効性のある不活化処理は、EDTA の添加であり、不可逆的な不活化効果は 40°C の加熱処理により得られると考えられた。従って、これらの併用が最もその効果を期待でき、菌体破碎液を調製する際は、菌体の超音波破碎前に EDTA を添加しておいた方が良いと考えられた。この併用条件で調製した菌体破碎液について ELISA 法への有用性を検討した。

菌体破碎液を固相化した ELISA プレートにおける冷水病自然感染耐過アユ血漿及び未感染アユ血漿の ELISA の結果を図 4 に示した。

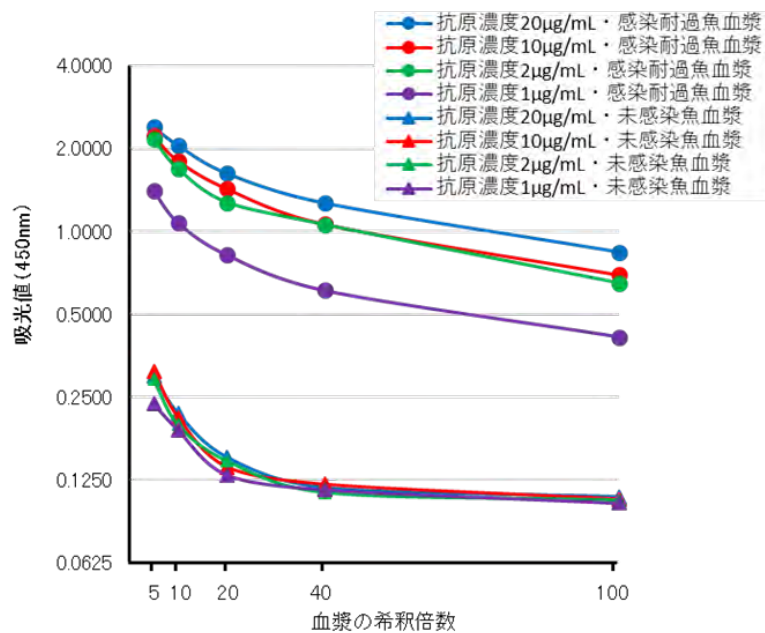


図 4. 自然感染耐過アユ血漿及び未感染アユ血漿の各希釈液に対する ELISA の

結果

自然感染耐過アユ血漿の各希釈液に対する ELISA の吸光値は、未感染魚アユ血漿の各希釈液と比較して顕著に高く、自然感染耐過アユ血漿の濃度及び固相化した抗原の量と相関していた。未感染魚アユ血漿の反応については、その 5 倍希釈液と 10 倍希釈液の吸光値が他の希釈液と比較して高くなる傾向があり、非特異反応が発生していると考えられた。従って、血漿の希釈は、20 倍以上が適当と推察された。固相化の抗原濃度については、感染耐過魚血漿の 20 倍希釈液の結果について考えると（図 5）、抗原濃度 1~2 $\mu\text{g/mL}$ における吸光値の増加に対する比例定数が 0.247 であったのに対して、抗原濃度 2~20 $\mu\text{g/mL}$ における比例定数が 0.0196 に減少することから、10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で十分量の抗原を固相化できていると考えた。

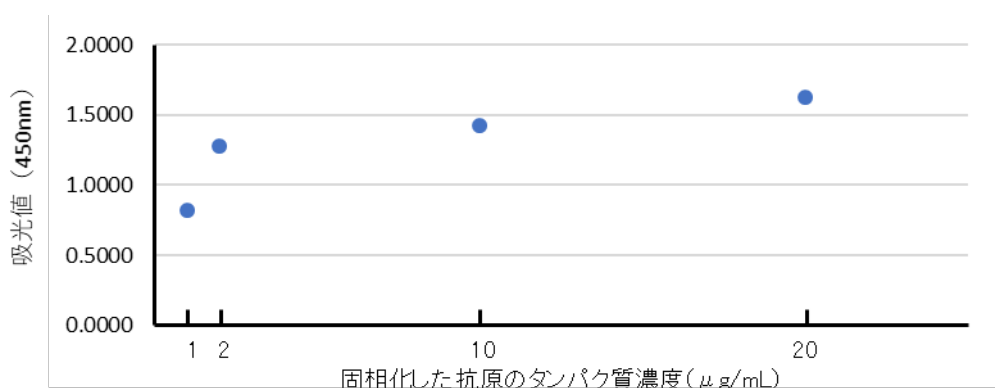


図 5. 固相化した各抗原濃度における自然感染耐過アユ血漿（20 倍希釈液）の反応

多数の検体を取り扱う場合、測定が複数のプレートに及ぶため、プレート間の発色反応のばらつきを補正する指標が必要になる。そこで、既知濃度の抗アユ IgM・マウスモノクローナル抗体の希釈系列を固相化したウェルを設け、これらの外部標準としての有用性を検討した。それぞれの固相化濃度における吸光値を ScanIt ソフトウェア（サーモフィッシャーサイエンティフィック）にてプロットしたところ、4 パラメーターロジスティック曲線への適合が認められたため（図 6）、発色の外部標準として有用であると考えられた。従って、菌体破碎液に対する抗体量の測定では、プレート毎に外部標準を設け、この標準曲線から算出される数値を抗体量の相対値として取り扱うこととした。

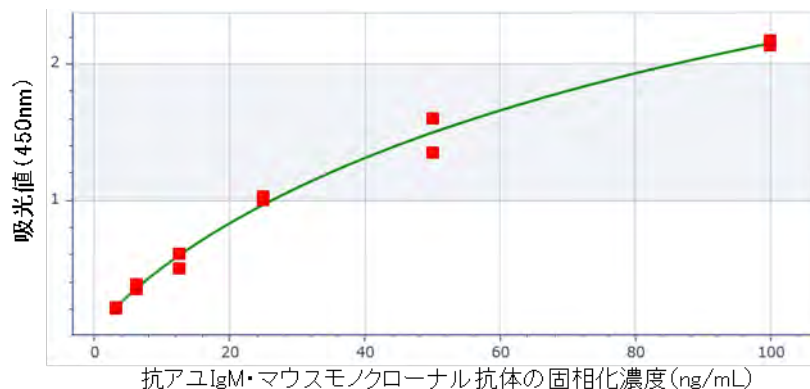


図 6. 抗アユ IgM・マウスモノクローナル抗体の希釈系列を固相化した各ウェル

の吸光値

上記結果を総括して、*F. psychrophilum* 菌体破碎液を抗原とした ELISA 法を構築し、外部標準により規格化した結果が得られるアユ冷水病の抗体価測定法を開発することができた。

参考文献

- 1) Kato G, Suzuki K, Sakai T, Kawakami M, Takano T, Matsuyama T, Nakayasu C. The role of a specific antibody against *Flavobacterium psychrophilum* infection in ayu sweetfish, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck & Schlegel, 1846). *J Fish Dis.* 2015, 38(1), 107-12.
- 2) 岡村貴司. ELISA を用いたアユ血清中の抗冷水病菌抗体の測定手法. 平成 23 年度滋賀県水産試験場事業報告
- 3) 金辻宏明. 酵素抗体免疫測定法による冷水病菌に対するアユ血中特異抗体検出系の作製. 平成 14 年度滋賀県水産試験場事業報告

坂井貴光、山崎雅俊（増養殖研究所）

山本充孝、金辻宏明（滋賀県水産試験場）

2) 冷水病自然発病魚に対する閉鎖循環飼育による抗病性付与技術の検証

【目的】

冷水病の再発を防ぎ抗病性を付与するため、閉鎖循環系の飼育水槽を活用した効率的な加温処理技術の開発を行う。

【材料及び方法】

アユの閉鎖循環飼育下での加温処理

アユ養魚池と形状が同じでスケールが約 1/15 の池を用いて琵琶湖で漁獲されたアユを収容して閉鎖循環飼育下での加温処理を行った。

[供試魚] 5月23日に琵琶湖のエリで漁獲され、魚体の大と小を選別器で選別して除いた平均体重 2.2g のアユを用いた。

[試験区] 試験区は、「閉鎖循環加温区」「かけ流し加温区」「かけ流し無加温区」を設けた。「閉鎖循環加温区」および「かけ流し加温区」は水量 5 トンの八角形コンクリート水槽にアユを 5 kg (約 2,300 尾) ずつ収容した。「かけ流し無加温区」は水量 0.7 トンの角型水槽に 1.5kg (約 680 尾) 収容した。閉鎖循環システムは、5 トンの飼育水槽と 500L FRP 水槽の生物濾過槽、送水ポンプ 1 基で構成した。生物濾過槽にはサンゴ砂を八角形飼育水槽の中央部にはプラスチック製担体を濾材として設置して硝化細菌を熟成させてから用いた。これらの閉鎖循環飼育システムにより送液ポンプで飼育水を循環させた。閉鎖循環飼育は飼育開始 3 日後から冷水病が発生して加温処理治療が終了した 10 日後までの 8 日間行った。なお、「閉鎖循環加温区」および「かけ流し加温区」は投げ込み式ヒーターを用いて飼育水温を *Flavobacterium psychrophilum* の至適増殖温度である 20℃に調整して冷水病の蔓延を促した。また、冷水病を治療するための加温処理は、「28℃3 日間」とした。加温治療の際は目的の水温へ半日程度かけて到達するように調整した。通常の飼育は水温 18℃の地下水を用いてかけ流した。飼育水における窒素化合物濃度 (NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N) を測定するために定期的に飼育水を採水した。また、冷水病菌の保菌状況をアユ疾病に関する防疫指針に記載された PCR 法で漁獲時には 60 尾、加温終了 2 日後および加温終了 2 1 日後の感染試験時に各区 30 尾ずつ調べた。

閉鎖循環飼育下で加温処理したアユの抗病性の付与状況の確認

「閉鎖循環加温区」「かけ流し加温区」において冷水病の自然発病を確認後、加温処理で治療したアユの冷水病に対する抗病性の付与状況を感染試験により再度冷水病に感染させて調べた。

〔供試魚〕加温処理 21 日後のアユを用いた。対照区として冷水病未経験の琵琶湖産アユを用いた。

〔感染方法〕冷水病菌 SG150804 株を 1/2CGY 液体培地を用いて 15°C で 24 時間振とう培養後、同培地で 21 時間拡大培養した培養菌液を地下水で希釈して供試魚を 30 分間浸漬した。供試魚は冷水病菌に感染させた後、水量 50L のアクリル水槽に 30 尾×2 水槽に収容して、21 日間経過観察した。冷水病に対する抗病性を評価するため、感染 21 日後の各試験区の累積死亡率を冷水病未経験アユと比較し、有効率 (RPS : $1 - (\text{試験区死亡率} / \text{未経験アユ死亡率})$) を求めた。

加温処理したアユに対する抗体価測定

「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」及び「対照区 (冷水病未経験の琵琶湖産アユ)」とこれらのアユに対する冷水病感染試験後の生残魚について、ELISA 法による抗体価測定を行った。

「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」及び「対照区」のアユのサンプリング (n=20) は感染試験の 3 日前に実施し、ヘマトクリット管を用いて尾柄部切断面より採血した。回収した血液をヘマトクリット管用の遠心分離に供し、得られた血漿画分を -80°C で凍結保存した。

冷水病の感染試験については、上述の抗病性の付与状況の確認と同条件で同時に行い、水量 50L のアクリル水槽に各試験区あたり 30 尾を収容して 21 日間飼育した。各試験区より攻撃後 7 日目に 10 尾をサンプリングし、これらの血漿を上記と同様に回収し、-80°C で凍結保存した。試験終了時の 21 日目は、全ての生残魚から血漿を採取し、凍結保存した。

ELISA 法による抗体価測定には、0.5% Tween20 含 TBS で 20 倍希釈した血漿 50 μ L を供試した。

【結果】

アユの閉鎖循環飼育下での加温処理

すべての試験区において収容 3 日目 (5/25) まで、漁獲および収容前のサイズ選別時のスレを原因とする死亡が発生し、その累積死亡率は約 15-22% であった。

「閉鎖循環加温区」および「かけ流し加温区」ともに、収容 4 日後に貧血、尾柄部潰瘍、穴あき等の冷水病による死亡魚が出現し、7 日目には冷水病による累積死亡率が 15% に達した (図 1)。そのため、両試験区とも 28°C の加温処理治療を行うと速やかに冷水病は終息した。50 日後 (7/12) の累積死亡率は「閉鎖循環加温区」が 34.8%、「かけ流し加温区」が 35.6% であった。「かけ流し無加温区」では、日間死亡率は 9 日目には 17.3% のピークに達して死亡がほぼ終

息した 50 日後の累積死亡率は 75.9%であった（スレによる死亡を含む）。閉鎖循環飼育システムを用いた飼育は、5/23～6/2 に行ったが、加温処理飼育期間を含め、システムに由来すると考えられる飼育環境の悪化等による死亡やアユの行動に異常は確認されなかった。また、窒素化合物濃度を測定した結果、かけ流し加温区と比較して NH₄ や NO₃ 値は高いものの飼育水として問題はない値であった（図 2）。

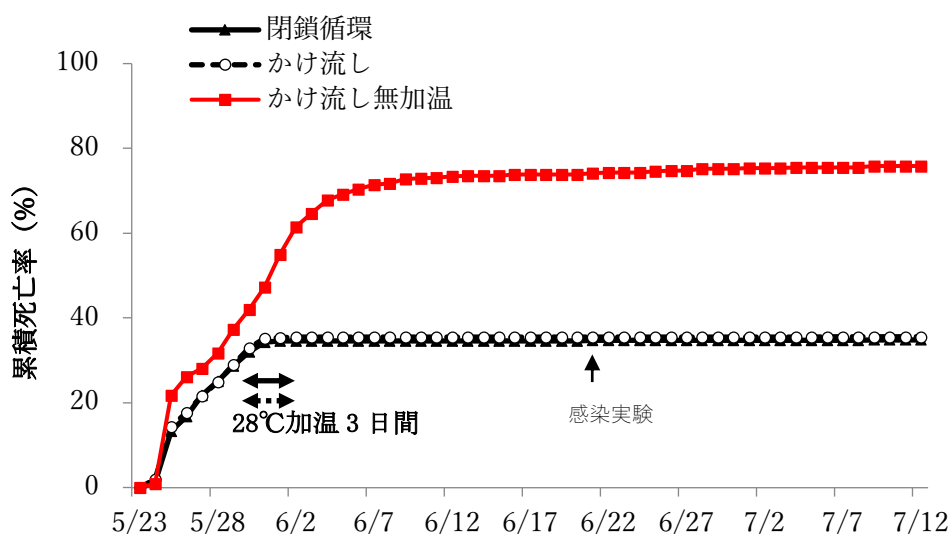
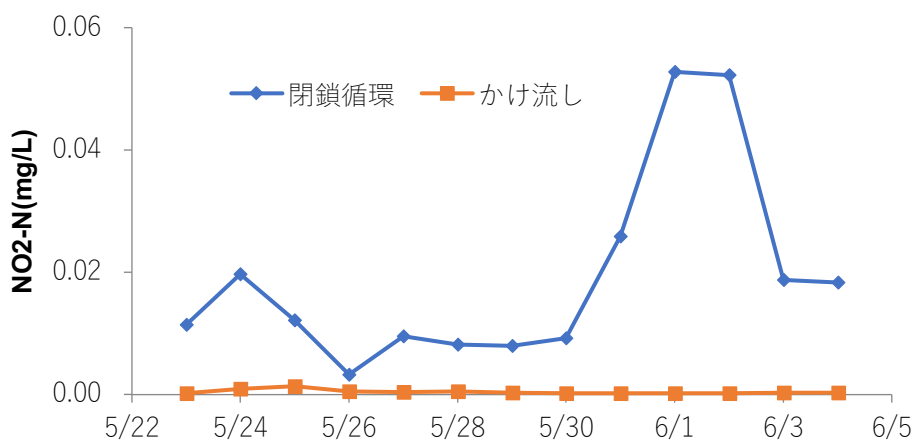


図1. 飼育試験における累積死亡率

- * 28°C加温 5/30-6/2 (閉鎖循環加温区、かけ流し加温区)
- * 5/25までは漁獲および選別によるスレが原因の死亡が発生



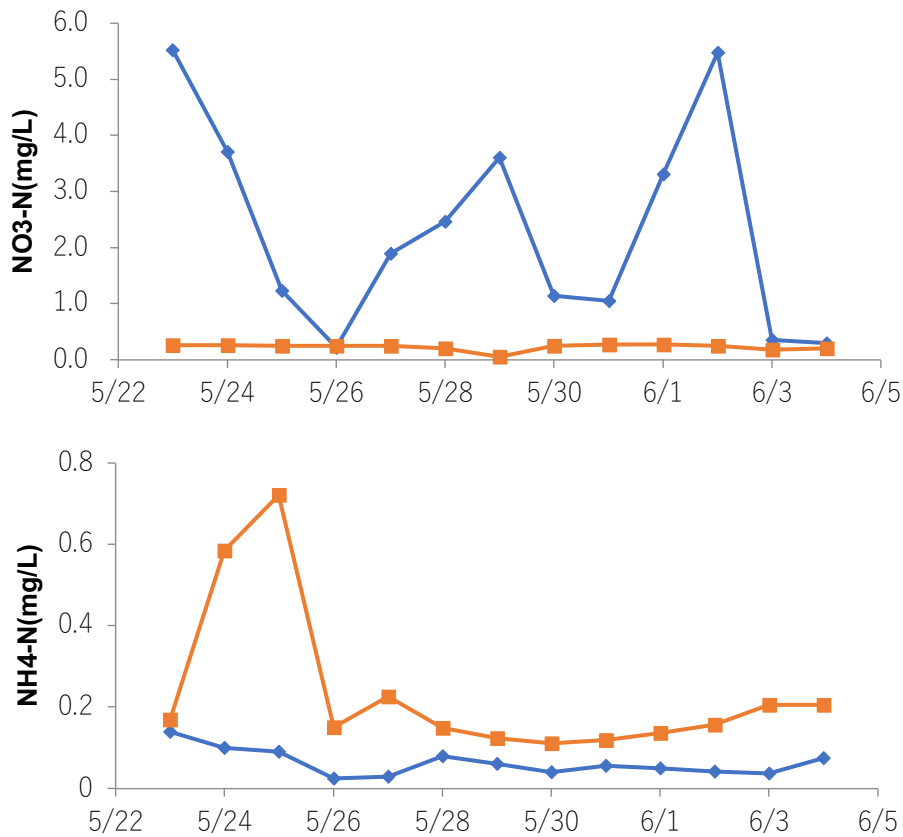


図2. 飼育試験における閉鎖循環加温区とかけ流し加温区の水質分析結果

閉鎖循環飼育下で加温処理したアユの保菌検査結果

表1に冷水病菌およびエドワジエラ・イクタルリ菌の保菌検査結果を示した。かけ流し加温区では加温終了2日後には冷水病菌 DNA が検出されたが、加温終了21日後には検出されなかった。一方、閉鎖循環加温区では加温終了2日後、21日後ともに冷水病菌 DNA が検出された。また、常に閉鎖循環加温区で保菌率はかけ流し加温区より高かった。

表1 冷水病菌およびエドワジエラ・イクタルリ菌の保菌検査結果

日時	状況	試験区	冷水病菌 鰓	冷水病菌 腎臓	エドワジエラ 菌
5月23日	漁獲時		2/60	-	0/60
6月4日	加温終了2日後	閉鎖循環加温	14/30	14/30	-
		かけ流し加温	1/30	5/30	-
6月21日	加温終了21日後	閉鎖循環加温	12/30	3/30	-
		かけ流し加温	0/30	0/30	-
	(収容20日後)	かけ流し無加温	8/30	8/30	-

閉鎖循環飼育下で加温処理したアユの抗病性の付与状況の確認

試験終了時の死亡率は、対照区の「冷水病未経験」が低濃度攻撃では 59.3%であったのに対して、「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」とともに 3.4%とともに対照区より有意 ($p < 0.01$) に低かった。また、高濃度攻撃区においては、対照区が 62.1%であったのに対して、「閉鎖循環加温区」で 3.3%、「かけ流し加温区」では 19.3%と死亡率が有意 ($p < 0.01$) に低かった (表 2)。なお、高濃度攻撃の「かけ流し加温区」では 2 個体が非感染性スレ症で死亡したため、表の死亡数から除外した。

表 2 感染試験結果 (SG150804株)

試験区		生残尾数	死亡尾数	死亡率 (%)	RPS (%)
低濃度 攻撃	閉鎖循環加温	57	2	3.4	94
	かけ流し加温	57	2	3.4	94
	control (未経験)	24	35	59.3	-
高濃度 攻撃	閉鎖循環加温	58	2	3.3	95
	かけ流し加温	46	11	19.3	69
	control (未経験)	22	36	62.1	-

※ 感染試験攻撃菌濃度： 1.0×10^7 、 1.0×10^8 CFU/mL

加温処理したアユの抗体価測定の結果

感染試験の 3 日前の「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」及び「対照区」の各個体の ELISA の結果を図 3 に示した。「対照区」では、全ての個体で検出限界以下であったのに対して、「閉鎖循環加温区」及び「かけ流し加温区」では、それぞれ 20 尾中 14 尾及び 16 尾で菌体破砕液に対する抗体が検出された。

感染試験後の各試験区における生残魚の ELISA の結果を図 4 に示した。低濃度攻撃及び高濃度攻撃における全ての試験区において、殆どの生残魚から菌体破砕液に対する抗体が検出され、冷水病に対する抗体の重要性が推察された。攻撃後 7 日目にサンプリングした個体については、十分量の血漿を採取することができなかつたため、ELISA には供試しなかつた。

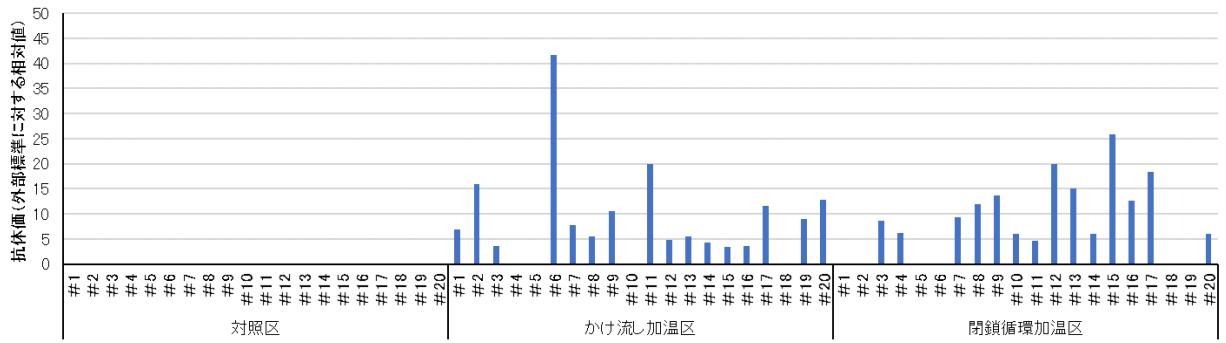
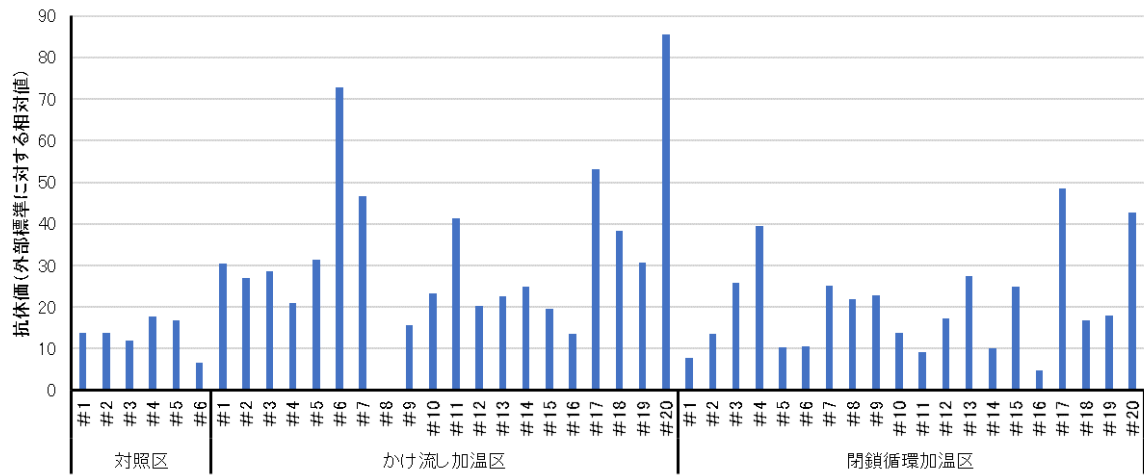
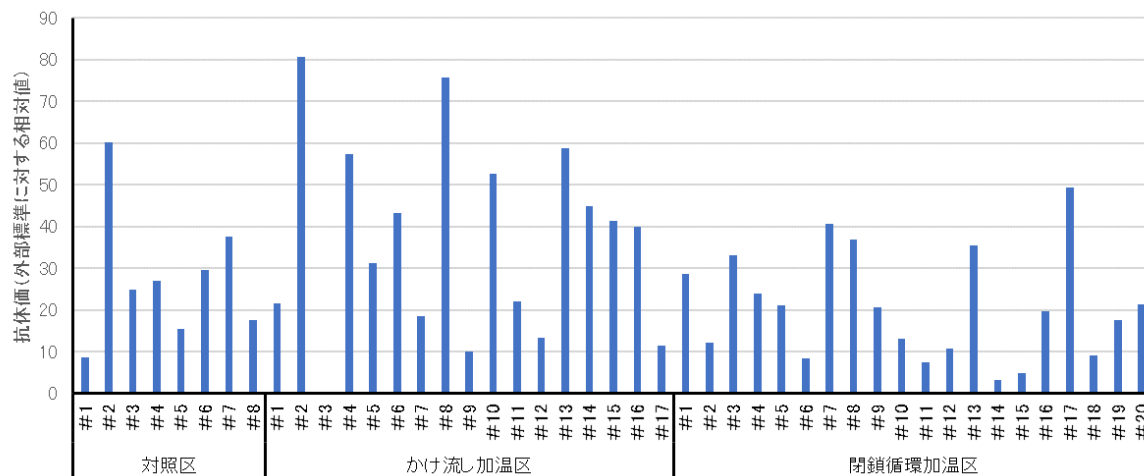


図3. 「閉鎖循環加温区」、「かけ流し加温区」及び「対照区」に対するELISAの結果



低濃度攻撃後の各試験区の生残魚



高濃度攻撃後の各試験区の生残魚

図4. 感染試験の各試験区の生残魚に対するELISAの結果

閉鎖循環飼育における省エネルギー効果

閉鎖循環飼育システムの特徴は、水を換えなくて飼育できるため省エネルギー効果があるとされている。本研究では、冷水病を治療するために飼育水温を28℃に保つ必要がある。この加温に要する費用の指標として加温時における消費エネルギー量を試算した。閉鎖循環飼育およびかけ流し飼育における加温飼育期間中の使用水量と閉鎖循環飼育時の放熱量補填熱量から、それぞれ3日間の加温飼育時に必要な総熱量を求めたところ、消費カロリーベースでは、かけ流し飼育が945,000 kcal であるのに対して、閉鎖循環飼育では約20分の1の53,042kcal となり、閉鎖循環飼育を行うと本試験の飼育条件では消費カロリーを94.4%削減できると試算された(図5)。

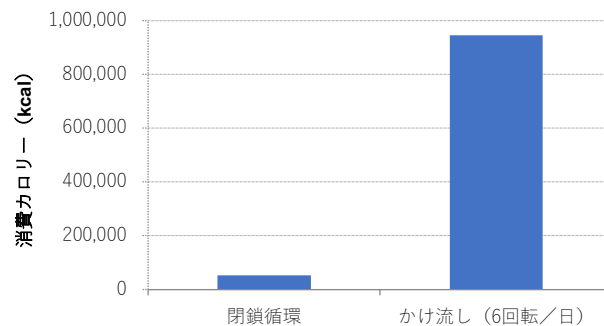


図5. 閉鎖循環飼育におけるエネルギー節約効果

【考察】

昨年度は6月に琵琶湖で漁獲されたアユを無治療で飼育したにも関わらず冷水病が発病しなかったため、冷水病に対する抗病性を評価できなかった。一方で、加温処理後に2年続けてエドワジエラ・イクタルリ感染症の発症を経験した。この経験から、ごく僅かな保菌率でもエドワジエラ・イクタルリを保菌している種苗群は、冷水病治療のために加温処理を行うと必ず発病して歩留りが低下することが分かった。そのため、今年度は加温してもエドワジエラ・イクタルリ感染症が発症しない4月および5月に漁獲されたアユに限定して試験を行ったところ、加温後もエドワジエラ・イクタルリ感染症が発病することなく実験を行うことができた。

次に、閉鎖循環飼育システムの有用性について、当初、本試験は4月に漁獲されたアユを用いて開始したが、8日後に閉鎖循環飼育区において水質悪化によって大量死した。この死因は窒素化合物濃度を測定した結果、アンモニア態窒素濃度は死亡が起こる前日に最大値の4.3mg/Lとなり、亜硝酸態窒素濃度が死亡時に最大値の2.2 mg/L (pH8.0) と高かったことから、硝化細菌による窒素化合物の生物学的処理が十分に機能していなかったと考えられた。そのため、5月には十分に熟成された硝化細菌を入手するとともに、事前に本閉鎖循環システムの硝化能力を測定してからアユを収容するようにしたため、アンモニア⇒亜硝

酸⇒硝酸の硝化作用が適正に進み水質悪化に起因する死亡はなかった。

以上の至適化した条件による閉鎖循環系での加温処理によるアユは、冷水病に対する感染試験においてその抗病性が認められ、高濃度攻撃に対しては「かけ流し加温」よりも高い抗病性を示した。さらに、感染試験前の抗体価測定において、「閉鎖循環加温区」及び「かけ流し加温区」の多くの個体で菌体破碎液に対する抗体が検出され、これらの加温処理を受けた多くの個体で *F. psychrophilum* に対する免疫が付与されていることが推察された。以上のことから、冷水病に対する抗病性付与に有用な閉鎖循環系の加温処理技術が開発されたと考えられた。

山本充孝、金辻宏明、孝橋賢一（滋賀県水産試験場）
坂井貴光、山崎雅俊（増養殖研）
（参考）

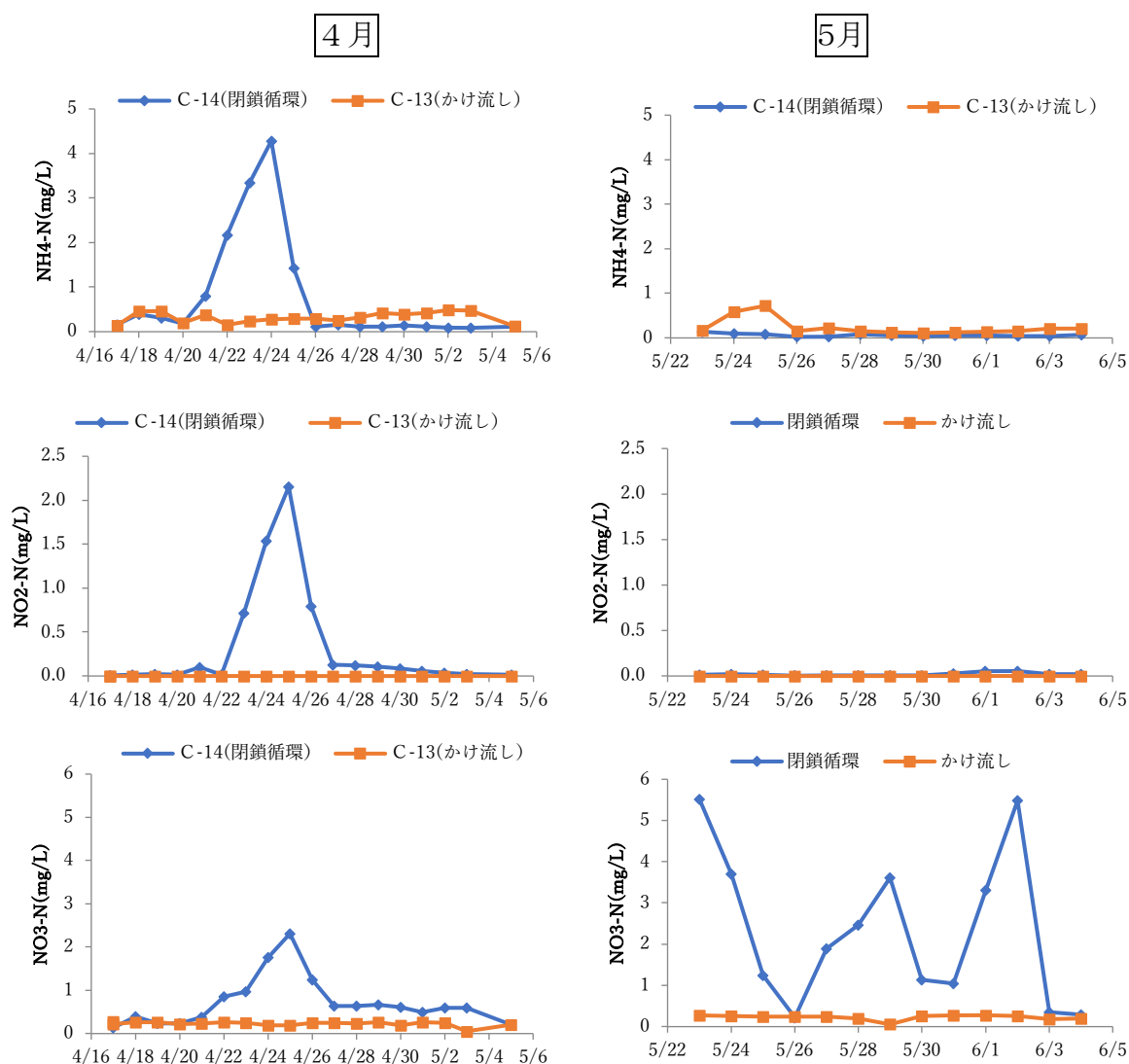


図4. 4月と5月に漁獲されたアユ飼育試験における水質分析の比較

平成 29 年度水産防疫対策委託事業（水産動物疾病のリスク評価）

アユの重要疾病の発生メカニズムの研究 （栃木県水産試験場）

【目的】

アユの冷水病は、細菌（*Flavobacterium psychrophilum*）による疾病である。体表の微細な傷から感染し、感染したアユは体表や筋肉中に炎症を起こし、そこからの出血によって失血死することが知られている（Miwa & Nakayasu 2005）。死亡しなかったとしても、活性低下によって釣れなくなる（桑田 2011）ことから、冷水病の発生は河川漁業へ大きな悪影響を与える。実際に、河川での発生が相次いだ 1993 年以降、アユの放流効果（放流量に対する漁獲量）が著しく低下し、漁獲量は減少の一途をたどっている（図 1）。

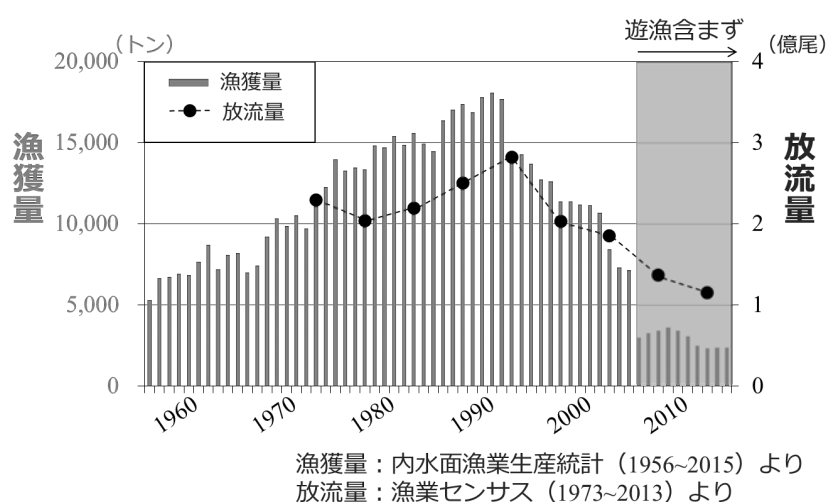


図 1 アユの漁獲量と放流量の推移

冷水病の発生を防ぐには、防疫が最も重要である。しかし、河川での防疫は困難である。実際に、栃木県内の無病の種苗が放流されている漁場でも、毎年冷水病が発生している。この漁場では、アユ漁の解禁日に 14%の釣り人がオトリアユ（アユの主要漁法である友釣りを使う生きたアユ）を他の水域から持ち込んでいた（2016 年の調査）。

そこで、冷水病の被害を軽減できるような放流手法を開発することを目的に以下の 5 つの調査を実施した。

- 1 冷水病の発生、終息時期の調査
- 2 河川間での冷水病タイプの比較
- 3 冷水病による被害量の調査
- 4 放流密度と釣れ具合の関係調査
- 5 河川水による飼育試験

【材料と方法】

1 冷水病の発生、終息時期の調査

栃木県内の13漁場に水温ロガーを設置し水温を計測した。また、漁場ごとに漁協組合員に釣れ具合や病魚、死魚の有無について毎日の記録を依頼した（図2）。釣れ具合の顕著な低下、もしくは病魚、死魚が確認された日を発生日とした。病魚、死魚がみられなくなり、釣れ具合の回復した日を終息日とした。



図2 調査場所

2 河川間での冷水病タイプの比較

1の調査で収集した病魚について、MightyPrep reagent for DNA (TaKaRa) を用いて total DNA を抽出し、以降の PCR に用いた。1st PCR は吉浦ら(2006)がロタマーゼ遺伝子上に設計したプライマー (FPS-1) を用いた。冷水病菌が検出された際は制限酵素 Hinf I による RFLP 解析 (吉浦ら 2006) により遺伝子型を判定した。

さらに、FPS-1 を挟み込むように設計したプライマーを用いて、PCR 増幅産物を得た後、石原・高木(2018)に従いシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

3 冷水病による被害量の調査

ダム湖系 A が放流された 2 漁場（図 3）で、冷水病発生直後と終息後の 2 回、潜水目視による個体数推定（高木&横塚 2017）を実施した。



図 3 調査場所

4 放流密度と釣れ具合の関係調査

3 漁協管内の 21 地点に流程 50m の調査区間を設定した（図 4）。解禁直前（解禁日まで 1 週間以内）に潜水目視で生息数を推定し、生息密度を算出した。解禁日に調査区内で釣りをしていた全ての釣り人から釣果と釣り時間を聞き取り、平均釣れ具合を求めた。



図 4 調査場所

5 河川水による飼育試験

那珂川の河川水を2本の人工水路に掛け流しとし、そこに3系統（海産系、ダム湖系A、ダム湖系B）の種苗を放流した（図5）。水路は幅2m、長さ24m、流量は4月が29L/s、5月が42L/s、6~7月が50L/sである。脂ビレないし腹ビレを切除することによって標識し、水路ごとに計90尾（海産系：30尾、ダム湖系A：30尾、ダム湖系B：30尾）となるように4月6日に放流した。

放流後は無給餌で飼育し、7月28日に取り上げた。

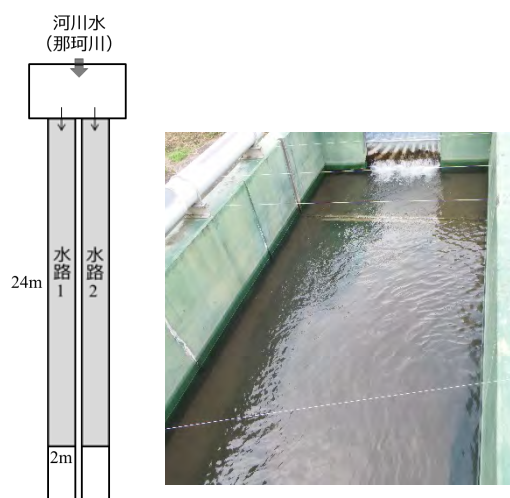
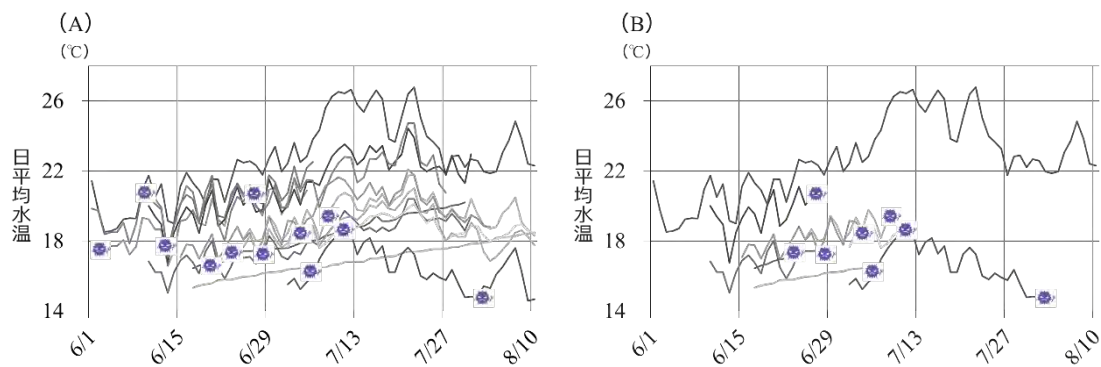


図5 実験水路

【結果と考察】

1 冷水病の発生、終息時期の調査

1漁場を除き、全ての漁場で冷水病が発生した（図6(A)、表1）。発生しなかった漁場は、天然遡上アユが豊富な那珂川であるため、冷水病による釣れ具合の低下が判別しにくかった可能性がある。



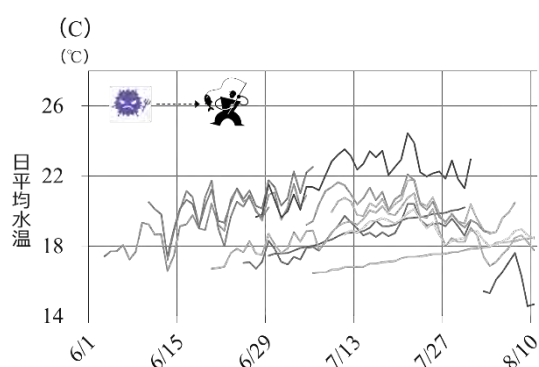


図 6 (A)冷水病発生状況、(B)解禁から発生までの水温の推移、(C)発生から終息までの水温の推移

表 1 冷水病発生、終息時期と水温

漁協	地点	解禁日	発生		回復		解禁から発生までの日数	発生から回復まで	
			日付	水温	日付	水温		日数	水温上昇
那珂川	烏山	6/1	—	—	—	—	—	—	—
鬼怒川	石井	6/3	6/3	17.4	7/5	20.9	0	32	3.5
	荒川	6/15	7/5	19.2	8/3	18.8	20	29	-0.4
黒川	小来川	6/10	6/25	17	7/31	19.4	15	36	2.4
	行川	6/10	6/27	19.6	7/31	22.9	17	34	3.3
	街中	6/10	6/10	20.5	7/6	22.5	0	26	2
西大芦	事務所前	6/17	7/6	16.5	8/10	18.5	19	35	2
	神舟	6/17	6/29	17.5	7/30	20.2	12	31	2.7
荒井川	荒井川	6/25	7/9	19.9	8/7	20.5	14	29	0.6
渡良瀬	野上川	6/25	6/20	16.7	—	—	-5	—	—
	秋山川	7/2	7/11	18.7	—	—	9	—	—
粕尾川	長ト口	7/2	6/13	17.2	6/29	20.2	-19	16	3
おじか・さぬ	男鹿川	7/2	8/2	15.4	—	—	31	—	—

発生時の水温は、平均 18.0°C（範囲：15.4~20.4°C）で、水温が低い漁場であっても冷水病が発生した。解禁日から冷水病の発生までは平均 17 日（範囲：9~31 日）で、水温が低い漁場のほうが発生までの期間が長い傾向がみられた（図 6(B)、表 1）。そのメカニズムは不明であるが、水温が低いことでアユも冷水病菌も活性が低く、感染の拡大が遅いのもかもしれない。ただし、解禁前に冷水病が発生してしまっている漁場もみられた。

また、水温に関係なく、発生から終息までは平均 30 日であった（図 6(c)、表 1）。つまり、解禁を早くする（＝水温の低い時期にアユ漁が始まる）ことで、冷水病発生までの日数を長くできること、これまでよりも冷水病が早い時期に発生したとしても終息までの期間は変わらないことが示唆された。

2 河川間での冷水病タイプの比較

2 河川 43 個体が PCR 陽性となり、RFLP 解析の結果、すべて A 型であった。

検出された A 型には変異がほとんどみられず、なんらかの経路で冷水病発生河川から周囲に広がっているものと推察された。解禁まで冷水病が発生していなかった河川でも、解禁後には冷水病の発生がみられることから、釣り人によって冷水病菌が河川に持ち込まれていることが疑われた。

3 冷水病による被害量の調査

西大芦漁協管内では、7月6日から8月2日までの27日間で、推定生息数が88,500尾(±27,700)から29,000尾(±6,000)へと減少した。黒川漁協管内小来川地区では、6月27日から8月4日までの38日間で、推定生息数が8,900尾(±4,500)から1,500尾(±400)へと減少した。冷水病発生時の生息数を100とすると、冷水病終息後の残存率は33%、17%と非常に低く、実質的に漁期が終了していた。

4 放流密度と釣れ具合の関係調査

生息密度が高いほど解禁日の釣れ具合は向上したが、その関係は直線的ではなく、頭打ちの傾向がみられた(図7)。たくさん放流するほど良く釣れるが、冷水病が発生したときの被害量も大きくなる。解禁後の冷水病発生を前提とせざるを得ない現状では、1尾/m²を目標に放流することが有効と考えられた。

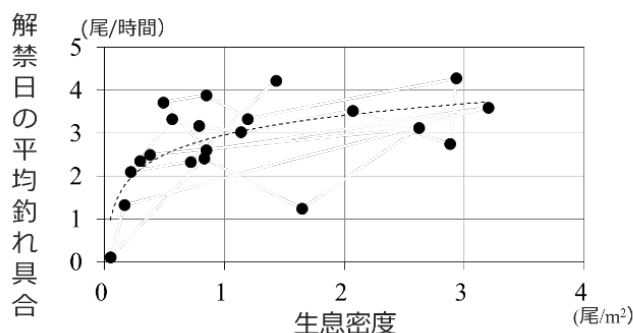


図7 生息密度と釣れ具合の関係

5 河川水による飼育試験

水路での残存個体数は海産系が最も多く、海産系種苗が冷水病に強いとこれまでの知見(例えば、永井 2010)に合致する結果であった。ただし、すべてが冷水病による減耗であったかは不明である。例えば、水路には2m間隔でテグスを設置しており、水路内に鳥類が入り込んでいる様子は確認できなかった

が、鳥類による捕食があった可能性は否定できない。しかし、少なくともダム湖系 A（栃木県内で多く放流されている）よりも海産系のほうが、河川での残存率が高い可能性が推察される。

表 2 水路での残存状況

	海産系	ダム湖系A	ダム湖系B
水路 ₁	27 (90%)	19 (63%)	5 (17%)
水路 ₂	24 (80%)	20 (67%)	8 (27%)
平均	85%	65%	22%

【引用文献】

- 桑田知宣. 「アユの科学と釣り」. 学報社. 2011.p158-164.
- S. Miwa and C. Nakayasu. Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ*. 2005 9;67(1-2):93-104.
- 高木優也・横塚哲也. 潜水目視で小河川のアユ生息数を推定する手法の検討. 栃木県水産試験場研究報告 2017; 60: 31-32.
- 石原学・高木優也. 河川における冷水病原菌 *Fravobacterium psychrophilum* 保菌状況および塩基配列の比較. 栃木県水産試験場研究報告 2018 (印刷中)
- 田畑和男. 河川環境中からの PCR 法による冷水病菌検出方法の検討. 兵庫農技総セ研報 (水産). 2006; 39: 29-32.
- 永井崇裕. 「アユを育てる川仕事」. 築地書房. 2010.p207-214.
- 吉浦康寿・釜石隆・中易千早・乙竹充. (2006) Peptidyl- prolylcis-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 2006; 41(2): 67-71.

高木優也・阿久津正浩・西村友宏 (栃木水試)

平成 30 年度水産防疫対策委託事業（水産動物疾病のリスク評価）

アユの重要疾病の発生メカニズムの研究 （栃木県水産試験場）

【目的】

アユの冷水病は、細菌（*Flavobacterium psychrophilum*）による疾病である。体表の微細な傷から感染し、感染したアユは体表や筋肉中に炎症を起こし、そこからの出血によって失血死することが知られている（Miwa & Nakayasu 2005）。死亡しなかったとしても、活性低下によって釣れなくなる（桑田 2011）ことから、冷水病の発生は河川漁業へ大きな悪影響を与える。実際に、河川での発生が相次いだ 1993 年以降、アユの放流効果（放流量に対する漁獲量）が著しく低下し、漁獲量は減少の一途をたどっている（図 1）。

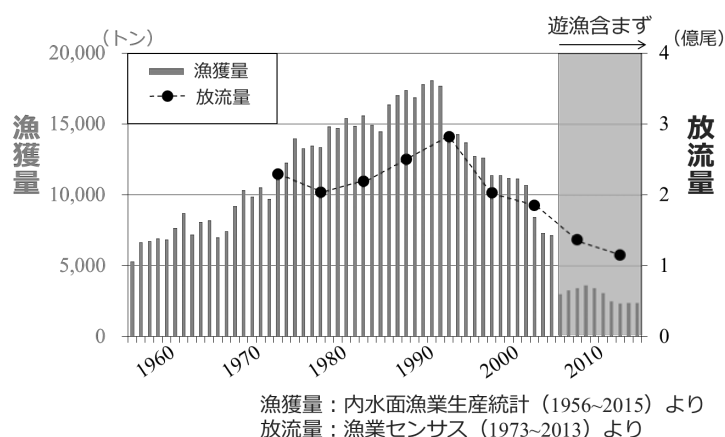


図 1 アユの漁獲量と放流量の推移

冷水病の発生を防ぐには、防疫が最も重要である。しかし、河川で防疫を徹底することは難しい。実際に、栃木県内で無病の種苗が放流されている漁場でも、毎年冷水病が発生している。この漁場では、アユ漁の解禁日に 14%の釣り人がオトリアユ（アユの主要漁法である友釣りを使う生きたアユ）を他の水域から持ち込んでいた。こうした状況に対して、釣り人への防疫の呼びかけを行うとともに、早期解禁（解禁時期を早める）をする漁場が増えている。早期解禁は、解禁から冷水病発生までの日数を長くするのに有効とされ、成功している中小河川もある（松浦ほか 2010）。しかし、データによる裏付けは十分ではない。また、大河川では解禁前に冷水病が発生する事例が多く、原因の解明が急務である。昨

年度の調査で、これまで栃木県内で多く放流されてきた種苗（ダム湖系 A）は、冷水病発生後に 17~33%しか残存していなかった。冷水病発生後にも漁場を維持するためには、冷水病に強い種苗の放流や追加放流が必要と考えられた。

そこで、冷水病の被害を軽減できるような放流手法の開発を目指し、以下の調査を実施した。

- 1 放流サイズに関する調査
- 2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査
- 3 追加放流の効果に関する調査
- 4 早期解禁の有効性に関する調査

【材料と方法】

1 放流サイズに関する調査

冷水病が問題となっていなかった時代、アユ放流は最低水温が 7~8℃を超える時期に実施するとされていた（アユ種苗の放流マニュアル 1994）。その後、冷水病対策として、アユ冷水病対策協議会（2004）が策定した放流指針に基づき、日間最低水温が 13℃以上での放流が推奨されてきた。しかし、その根拠は乏しい。また、放流時期が遅くなると、種苗サイズが大型化する。大型種苗ほど冷水病被害が小さいという結果となっていない限り、種苗サイズが大型化するほど放流効果は減少すると考えられる（図 2）。

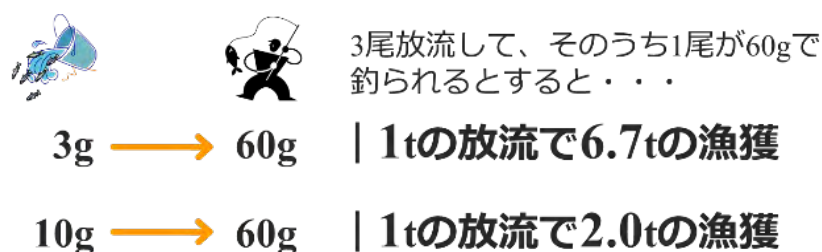


図 2 放流サイズによる放流効果の違い

そこで、日間最低水温が 13℃以上での放流を推奨した根拠について、文献調査及び、当時の状況を知る内田和男博士（全国内水面漁業協同組合連合会 専務理事）への聞き取りを実施した。また、放流サイズと冷水病被害に関する文献調査を実施した。

2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査

冷水病に強いとされる海産系種苗 4.7 万尾（平均 3.8g）を利根川水系黒川（黒川漁協管内、日光市小来川地区）に放流した。解禁日の釣獲状況を調査（高木&酒井 2018）するとともに、冷水病発生直後と終息後の 2 回、潜水目視による個体数推定（高木&横塚 2017）を実施し、冷水病による減耗を調べた。これらを、昨年度（ダム湖系 A を放流）の結果と比較した。

3 追加放流の効果に関する調査

利根川水系鬼怒川（鬼怒川漁協管内、さくら市氏家地区）に、脂ビレ切除によって標識したダム湖系 B（H29 とは異なる系統）を 1.2 万尾放流した。この漁場の解禁日は 6 月 3 日であり、4 月中に同系統の種苗が約 13 万尾放流されている（図 3）。クリールセンサス（高木ほか 2017）から、追加放流後の釣獲状況を調査した。

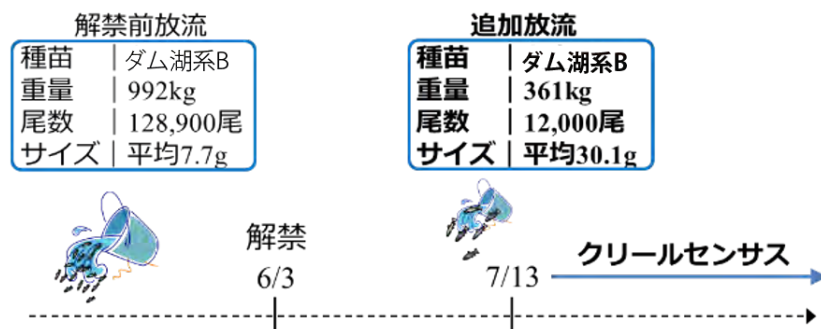


図 3 氏家地区の放流状況

4 早期解禁の有効性に関する調査

水温が低い漁場ほど、早く解禁する漁場ほど、解禁日から冷水病発生までの日数が長いとなれば、早期解禁は有効と言える。そこで、冷水病の発生と水温の関係を知るため、栃木県内の 16 漁場に水温ロガーを設置した。また、漁場ごとに漁協組合員に釣れ具合や病魚、死魚の有無について毎日の記録を依頼した。ただし、早期解禁している漁場ほど解禁日から冷水病発生までの日数が長いという結果が、解禁を早めることが冷水病発生までの日数を長くすることを保証するとは限らない。例えば、ほかに解禁している漁場が少ないほど、冷水病菌が持ち込まれるリスクが低いことがその原因とすれば、すべての漁場が解禁を早めると、全体的に冷水病発生も早まるかもしれない。また、温暖化や渇水によって水温も上昇しやすくなっていると考えられる。

そこで、実際に解禁を早めた漁場の状況について追跡調査した。

【結果と考察】

1 放流サイズに関する調査

日間最低水温が 13℃以上での放流が冷水病被害を軽減したという報告は見つからなかった。同様に、大型種苗の放流によって冷水病被害が軽減したという報告も見つからなかった。これは、1993 年以降、一貫して放流効果が低下したままである現状を裏付ける（図 1）。

内田和男博士によると、「最低水温 13℃以上での放流は、人工種苗の放流を考えて出された基準である。当時、冷水病によって湖産アユの放流効果が低下し、人工種苗の放流量が増加していた。まだ生産技術が低い種苗生産施設も多く、それまでの基準である最低水温 7～8℃を超えた時期に放流すると漁場から降下してしまうことが多かった。アユ種苗は 13～16℃で飼育されていることが多いことから、なるべく放流時の水温差を小さくするために、13℃以上での放流を推奨した。」とのことであった。つまり、生産技術が向上し、無病かつ質の高い種苗が入手可能な現在においては、指針通りに放流することは、冷水病被害の軽減に寄与しない。むしろ、放流サイズが大型化することによって放流効果が低下してしまう可能性が高い。実際に、冷水病対策会議の指針より早期に小型の種苗を放流したほうが、費用対効果が高いという報告が、近年相次いでいる（佐藤 & 坪井 2018. 加地 2018）。

2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査

解禁日（6月9日）の釣獲状況を調査した。7月4日に冷水病発生時の生息尾数を、8月2日に冷水病終息後の生息尾数を調査した。7月4日から8月2日までの生息尾数の減耗分を、冷水病による被害量と仮定した。

これらを昨年度の結果と比較したところ、海産系種苗の放流によって冷水病被害は大きく減少した（表 1）。しかし、解禁日の釣れ具合、回収率も低下してしまった。一般的に、湖産系種苗は友釣りで釣られやすいと言われている（アユ種苗の放流マニュアル 1994）。また、ある程度までは継代が進んだ種苗のほうが、警戒心が低く釣りやすいとされている（Tsuboi et al. 2018）。釣り人に驚いてアユが逃げ回る様子も観察されており、警戒心の高さによって、アユがいても釣れない状況にあったと推察された。

栃木県内の各漁協におけるアユ放流尾数を年券購入者数で除した“年券購入者1人当たりのアユ放流尾数”の平均は211尾である(表2)。放流から解禁までの減耗を無視すると、解禁直後は1人1日当たりダム湖系Aで平均15尾(211尾×7.1%)、海産系で平均3.4尾(211尾×1.6%)の釣獲が期待されることになる。栃木県内の中小河川の場合、解禁日に“良く釣れた”と評価されるには平均釣果20~30尾程度は必要である。したがって、現在の条件では、海産系種苗の放流によって冷水病被害を軽減できたとしても、良く釣れる漁場をつくることを難しいと考えられた。ただし、調査河川は川幅10mほどの小河川であり、解禁日は渇水であった。つまり、警戒心の高い種苗にとっては厳しい条件であった。平水以上の条件や、流量の多い河川では、回収率が向上することが期待される。また、放流尾数が多い河川では、回収率が低い種苗であっても1人1日当たりの釣獲尾数は増加する。このような条件を併せ持つ河川では、海産系種苗の単独放流で、釣れる漁場の造成と冷水病被害の軽減を両立できる可能性がある。

表1 釣獲状況と冷水病による減耗率

調査年	放流種苗	解禁日の釣獲状況		冷水病による減耗
		平均釣れ具合 (尾/時間)	回収率 (釣獲尾数/放流尾数)	
2017	ダム湖系A	2.82	7.1%	83%
2018	海産系	1.77	1.6%	37%

表2 栃木県内の各漁協における年券購入者1人当たりのアユ放流尾数

(2016年のデータ)

漁協	年券枚数 (枚)	放流尾数 (万尾)	一人当たり (尾)
A	3,970	183	461
B	533	20	375
C	78	3	372
D	678	15	221
E	819	18	220
F	592	13	220
G	103	2	194
H	1,280	24	188
I	1,120	19	165
J	415	6	147
K	10,186	114	112
合計	19,774	417	211

3 追加放流の効果に関する調査

追加放流日から8月31日までクリアルセンサスを実施した。9月は連続した台風によって、釣りができる日数が非常に少なかったため、データに含めなかった。放流翌日から追加放流魚の釣獲が確認された(図5)。また、調査期間中の1人1日当たりの釣果のうち、平均28%が追加放流魚であった。つまり、追加放流が釣果の向上に貢献することが確かめられた。ただし、放流サイズが大きいことと、成長する期間を与えずに釣獲することによって、361kgの種苗を放流して144kgの回収に留まった(表3)。したがって、追加放流の放流効果は低いと言わざるを得ない。また、追加放流に増殖経費を充てることは、通常の放流を減らすことにつながる。①増殖経費が潤沢で、追加放流をしてもなお十分に通常の放流ができる。②冷水病による被害量が著しく大きい一方で、追加放流魚の回収率が十分に高い。これら2つの条件を満たすような漁場でない限りは、追加放流をすべきではないと考えられる。

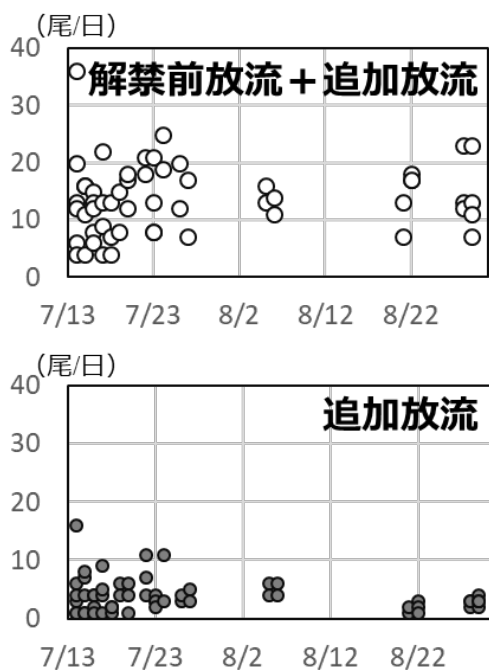


図5 追加放流後の釣獲状況の推移

表3 追加放流魚の回収率

	放流量	釣獲量	回収率
尾数 尾)	12,000	3,725	31%
重量 kg)	361	144	40%

4 早期解禁の有効性に関する調査

本調査は、3年計画でデータを収集している。2年目である今年、水温ロガーが回収できて、かつ解禁前に冷水病の発生が見られたのは8漁場であった。昨年の7漁場と合わせて、解禁から冷水病発生までの期間を応答変数、解禁日と発生時の水温を説明変数とする回帰分析を行った。水温が低い漁場ほど、冷水病発生までの期間が長い傾向が見られたが、ばらつきが大きく統計的に有意とは言えなかった。今後、データの積み増しが必要である。

2017年から解禁を早めた2漁場（西大芦漁協、荒井川漁協）について、2016年までの状況と比較した。荒井川漁協では、2016年まで7月の第2日曜が解禁であったが、2017年から6月の第4日曜へと2週間解禁を早めた。その結果、それまでは解禁日に冷水病が発生してしまうことが続いていたが、2017年、2018年ともに、冷水病が発生したのは解禁から2週間以上経過してからとなった。一方で、西大芦漁協では、2016年まで6月の第4日曜が解禁であったが、2017年から第3土曜へと解禁を早めた。しかし、2017年、2018年ともに、漁場の最下流部のみではあるものの、解禁日から冷水病の発生が見られた。2019年は、鬼怒川漁協が6月3日から5月26日へ解禁を早める予定である。これら3漁場については、今後の状況を注視していく必要がある。

【引用文献】

- 桑田知宣. 「アユの科学と釣り」. 学報社. 2011.p158-164.
- S. Miwa and C. Nakayasu. Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ*. 2005 9;67(1-2):93-104.
- 松浦秀俊・友保礼次郎・高橋勇夫. 「アユを育てる川仕事」. 築地書館. 2010.p124-132.
- アユ冷水病対策協議会. アユ冷水病防疫に関する指針. 東京. 2004.
- アユ種苗の放流マニュアル. 全国内水面漁業協同組合連合会. 1994.
- 高木優也・横塚哲也. 潜水目視で小河川のアユ生息数を推定する手法の検討. 栃木県水産試験場研究報告 2017; 60: 31-32.
- 高木優也・酒井忠幸. 解禁日における放流アユの回収率. 栃木県水産試験場研究報告 2018; 61: 40-41.
- 高木優也・横塚哲也・星野繁. 小河川に放流されたアユの回収率. 栃木県水産試験場研究報告 2017; 60: 37-38.
- 佐藤正人・坪井潤一. アユ友釣り漁場管理における早期小型放流の有用性. 水産増殖 2018; 66(3): 227-233.

加地弘一．県産アユ種苗の有効活用に関する研究-Ⅱ．山梨県水産技術センター
研究報告 2018; 45 号.

Jun-ichi Tsuboi, Kohichi Kaji, Shinya Baba, Robert Arlinghaus. Trade-offs in the
adaptation towards hatchery and natural conditions drive survival, migration, and angling
vulnerability in a territorial fish in the wild. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic
Sciences*,

<https://doi.org/10.1139/cjfas-2018-0256>

高木優也・酒井忠幸（栃木水試）

平成 31 年度水産防疫対策委託事業（水産動物疾病のリスク評価）

アユの冷水病の発生状況の把握及び対策の検討 （栃木県水産試験場）

【目的】

アユの冷水病は、細菌（*Flavobacterium psychrophilum*）による疾病である。体表の微細な傷から感染し、感染したアユは体表や筋肉中に炎症を起こし、そこからの出血によって失血死することが知られている（Miwa & Nakayasu 2005）。死亡しなかったとしても、活性低下によって釣れなくなる（桑田 2011）ことから、冷水病の発生は河川漁業へ大きな悪影響を与える。実際に、河川での発生が相次いだ 1993 年以降、アユの放流効果（放流量に対する漁獲量）が著しく低下し、漁獲量は減少の一途をたどっている（図 1）。

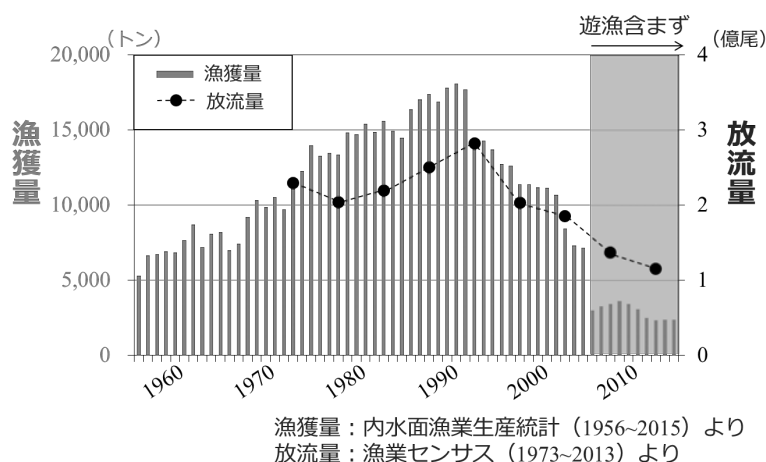


図 1 アユの漁獲量と放流量の推移

冷水病の発生を防ぐには、防疫が最も重要である。しかし、河川で防疫を徹底することは難しい。実際に、栃木県内で無病の種苗が放流されている漁場でも、毎年冷水病が発生しているが、特に、解禁前に冷水病が発生する事例が確認され問題となっている。このような状況に対応するため、県では冷水病の発症前に解禁を前倒しできるような内水面漁業調整規則を改正した。早期解禁は、解禁から冷水病発生までの日数を長くすることに有効とされ、成功している中小河川もあるが（松浦ほか 2010）、データによる裏付けは十分ではない。本事業による調査で、これまで栃木県内で主に放流されてきた種苗（ダム湖系 A）は、冷水病発

生後に 17~33%しか残存していなかった。冷水病発生後にも漁場を維持するためには、冷水病に強い種苗の放流や追加放流による対応などが必要と考えられた。

そこで、冷水病の被害を軽減できる放流手法の開発を目指し、以下の調査を実施した。

- 1 冷水病発生状況調査
- 2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査
- 3 追加放流の効果に関する調査
- 4 早期解禁した漁場の事例調査

【材料と方法】

1 冷水病発生状況調査

栃木県内の 14 漁場に水温ロガー（HOBO ティドビット v2 300m 防水温度ロガー）を設置し、河川水温を計測した。各漁場を管内とする漁協組合に対して冷水病の発生時について確認を依頼し、病魚が確認された日を発症日とした。

2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査

2018 年から放流種苗として導入されたハイブリッド系種苗 2.9 万尾（平均 5.2g）を利根川水系黒川（黒川漁協管内、日光市小来川地区）に放流した。ハイブリッド系は、ダム湖系 A とダム湖系 B を交配させた種苗で、現場では比較的冷水病に強いと言われるダム湖系 B の特性とダム湖系 A の釣れ具合の良さの両面を持った種苗となることが期待された。

そこで、排水飼育法による感染試験を実施し、他県由来のダム湖系 C、ダム湖系 A、海産系及びハイブリッド系の系統別の抗病性について検証した。菌株は、県内の河川において冷水病を発症したアユから分離した株を使用した。

併せて、解禁日の釣獲状況を調査（高木&酒井 2018）するとともに、冷水病発生直後と終息後の 2 回、潜水目視により個体数を計数し、冷水病による減耗を調べた。これらを、一昨年度（ダム湖系 A）および昨年度（海産系）の結果と比較した。

3 追加放流の効果に関する調査

利根川水系鬼怒川（鬼怒川漁協管内、さくら市氏家地区）において、7 月 8 日に脂ビレ切除によって標識した成魚サイズのアユ（平均 33g）1.2 万尾を放流した。この漁場の解禁日は 5 月 26 日で、4 月中に 6.6~7.9g の種苗が約 14 万尾放流され

ており、6月13日に冷水病の発生が確認されている。追加放流当日に、漁協組合員に釣獲日誌を配布し、釣行日、釣獲尾数および標識魚の尾数の記録を依頼した。

4 早期解禁した漁場の事例調査

本県ではアユの冷水病被害の軽減を目的として、解禁日を早める漁協が出てきている。今年度は鬼怒川を漁場とする鬼怒川漁協の解禁日に合わせ、釣り人に対して冷水病の発生状況について聞き取り調査を行った。併せて、2017年度から早期解禁を行っている荒井川漁協及び西大芦漁協についても引き続き調査を行った。

【結果と考察】

1 冷水病発生状況調査

14漁場のうち水温データを回収でき、冷水病の発生が確認されたのは10漁場だった。冷水病発生時の平均水温は17.0℃（範囲：14.5~19.5℃）で、冷水病が発生しやすいとされる15~19℃の水温帯（アユ冷水病対策協議会 2011）と概ね一致していた（表1）。

表1 冷水病の発生状況（令和元年）

漁協名	漁場	放流日	解禁日	発症	
				日付	水温
那珂川北部	黒羽	4/8	6/1	5/20	18.0
	箒川	4/16	6/1	5/10	19.5
鬼怒川	上河内	4/16	5/26	6/13	17.1
	石井	4/21	5/26	6/7	18.0
	田川	5/13	6/15	6/26	19.1
渡良瀬	渡良瀬	5/10	6/9	6/12	16.9
黒川	板荷	4/4	6/8	6/15	15.7
	小来川	4/10	6/8	7/1	15.3
西大芦	大芦川	5/8	6/15	6/26	15.8
塩原	箒川	5/11	6/30	6/5	14.5

2017年度から今年度までのデータを集計し、解禁日から発生までの日数と解禁時の水温の関係を見ると、水温が低い漁場ほど発症までの日数が長い傾向が見られたが（図2）、統計的に有意ではなく（無相関検定, $p > 0.05$ ）、今後のデータの積み増しが必要と考えられる。

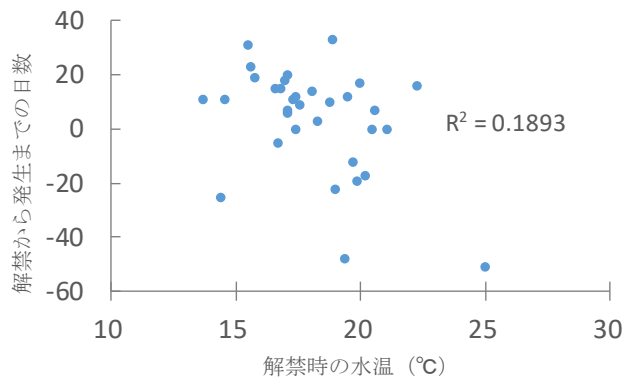


図2 冷水病の発生までの日数と解禁時の水温（マイナスは解禁前に発生）

2 冷水病に強い種苗の放流効果に関する調査

感染試験によるハイブリッド系の生残率は 87%で、海産系 (97%) に比べて劣るものの、ダム湖系 A の 59%に比べて有意に高かった (p 値を Benjamini & Hochberg 法で調整した Fisher の正確確率検定による多重比較, $p < 0.01$ 、図 3)。このことから、ハイブリッド系はこれまで放流種苗として主に使用されてきたダム湖系 A に比べて抗病性の高い種苗と考えられる。

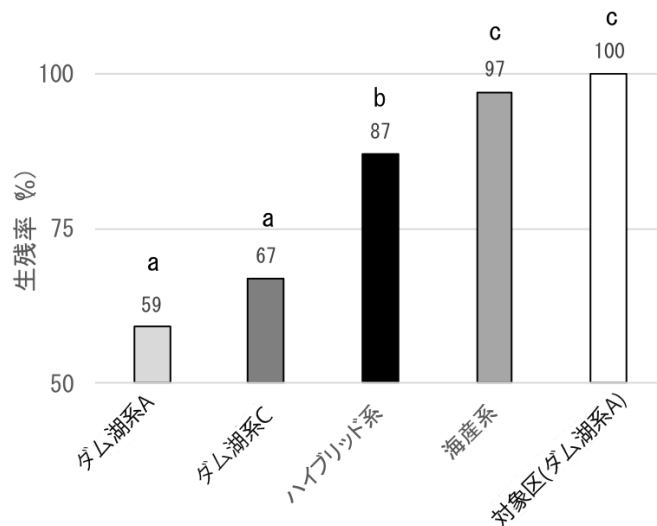


図3 冷水病感染試験での系統別生残率
 ※異なるアルファベットは有意差があることを示す。

解禁日（6月8日）の釣獲状況を調査した。冷水病発生直後の7月9日および冷水病終息後の8月27日に潜水目視調査を行った。7月9日から8月27日までの目視尾数の減耗分を、冷水病による被害量と仮定した。これらを過去2年間の結果と比較したところ、ハイブリッド系種苗の解禁日の釣れ具合は海産系種苗より高く、ダム湖系Aと同等だった（表2）。一方で減耗率は75%とダム湖系（83%）に比べて少なかったが、海産系（37%）の約2倍となった（表2）。

表2 利根川水系黒川における釣獲状況と冷水病による減耗率

調査年	放流種苗	解禁日の釣れ具合 尾/時間)	冷水病による減耗
2017	ダム湖系A	2.82	83%
2018	海産系	1.77	37%
2019	ハイブリッド系	2.82	75%

過去の調査では、冷水病の発生から終息までの期間は平均30日だったことが報告されているが（高木ほか 2017）、今年度は49日と長期にわたって発生が続いた。今年度は6月から8月にかけて天候不順が続き、解禁後の平均水温は冷水病が発生しやすい15~19℃の水温帯（アユ冷水病対策協議会 2011）で概ね推移していた（図4）。また、近隣の今市観測所では平年値（6~8月の合計）を435mm上回る降水量が記録された。これらのことから、冷水病の発生期間の長期化と多量の降水に伴う河川の増水によって減耗が大きくなった可能性が考えられる。

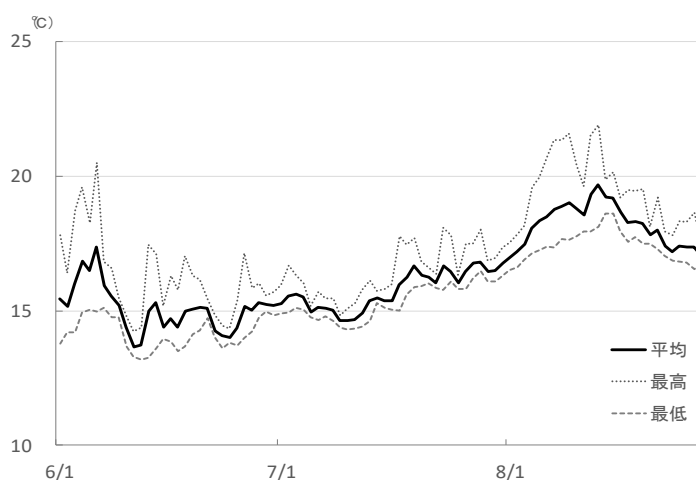


図4 河川水温の経時変化（黒川）

また、箒川上流部（那珂川水系）に放流されたハイブリッド系種苗は冷水病の発生中や発生後も比較的良好な釣れ具合だった（1人1時間あたりの釣れ具合：3.57~8.59尾）ことが確認されている。なお、同漁場では冷水病の発生中に河川の増水は確認されなかった。このことから、ハイブリッド系はダム湖系Aに比べて耐病性が高く、海産系に比べて釣れ具合の良い系統であると考えられる。

今回の調査では、河川での放流試験と併せて、河川由来の菌株を使用した感染試験によって系統ごとの抗病性を評価したところ、両者の結果は概ね一致していた。今後、新たな系統の種苗を導入する際には、漁場で発生した冷水病菌株を使用した感染試験を行い、生残率の良い系統を放流種苗として選択することにより、漁場における冷水病の被害抑制につながると考えられる。

3 追加放流の効果に関する調査

追加放流当日の7月8日から8月31日までの間に延べ152人・日分の釣獲データが得られた。追加放流魚は放流当日から釣獲された（図5）。

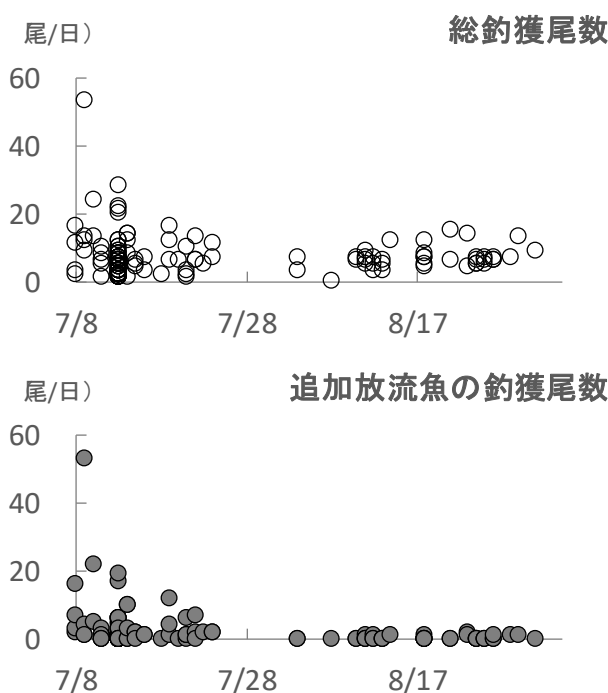


図5 追加放流後の釣獲状況の推

期間中の釣り人1人1日あたりの釣果のうち平均で28.8%を追加放流魚が占めた（表3）。月ごとに追加放流魚の割合を見ると、7月は37.9%だったのに対し、8月は4.5%に減少した（表3）。今年度の追加放流は、漁場での冷水病が終

息していない状況で行われ、7月下旬に追加放流魚で冷水病の発生が確認された。昨年度の調査では、漁場での冷水病の終息後に追加放流を行っており、追加放流魚の冷水病の発生は確認されなかった。また、8月においても平均釣果の21.7%が追加放流魚だったことから（表3）、追加放流は漁場での冷水病の終息後に行うことが望ましいと考えられた。

表3 追加放流魚および通常放流魚の釣獲状況

2019	通 期		7月		8月		備 考
	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	
追加放流魚	1.9	28.8	2.5	37.9	0.3	4.5	冷水病 発生中
通常放流魚	4.7	71.2	4.1	62.1	6.3	95.5	
計	6.6		6.6		6.6		

2018	通 期		7月		8月		備 考
	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	平均釣果 尾/日)	割合 (%)	
追加放流魚	3.9	27.7	4.2	30.0	3.1	21.7	冷水病 終息後
通常放流魚	10.2	72.3	9.8	70.0	11.2	78.3	
計	14.1		14.0		14.3		

4 早期解禁した漁場の事例調査

鬼怒川漁協の解禁日はこれまで6月の第1日曜だったが、今年度は5月の第4日曜へ1週間解禁を早めた。解禁日に主要8漁場の釣り人102人に聞き取りするとともに、漁場の状況を確認したところ、冷水病の発生は確認されなかった（表4）。

表4 冷水病の発生状況と釣れ具合（鬼怒

調査年	解禁日	冷水病の 発生状況	平均釣れ具合 (尾/人/1時間)
2017	6/3	発生	1.17
2018	6/3	発生	1.65
2019	5/26	未発生	1.89

近年の鬼怒川では解禁日に冷水病が発生する状況が続いており、釣り人1人1時間あたりの平均釣れ具合は1.17~1.65尾だった。今年度は解禁5日前に発生した増水の影響により、平均釣れ具合は1.89尾と過去2年間に比べて微増に留ま

ったが、釣り人から「釣れない」との不満は聞かれなかった。なお、今年度冷水病が発生したのは解禁から12日後の6月7日だった。

平成29年度から解禁を早めた荒井川漁協及び西大芦漁協では、両漁協とも解禁日に冷水病は発生しなかった。荒井川漁協では解禁を早めた3年間で、解禁日に冷水病は発生していない。西大芦漁協では、平成29年、30年の2年間は解禁日に冷水病が発生したが、最下流部での発生に留まり、今年度は発生しなかった。また、釣り人1人1時間あたりの平均釣れ具合は早期解禁前の2.83尾から、早期解禁後は3.77~4.58尾に改善しており、冷水病が発生しなかった今年度は調査した4年間で最も高かった(表5)。これらの事例から、早期解禁は解禁日の冷水病被害を抑制するために有効と考えられる。早期解禁の有効性を評価するため、今後もこれら3漁協の状況を注視し、事例を蓄積していく必要がある。

表5 冷水病の発生状況と釣れ具合(西大芦)

調査年	解禁日	冷水病の発生状況	平均釣れ具合(尾/人/1時間)
2016	6/26	発生	2.83
2017	6/17	一部で発生	3.77
2018	6/16	一部で発生	4.19
2019	6/15	未発生	4.58

【引用文献】

- S. Miwa and C. Nakayasu. Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis Aquat Organ.* 2005 9;67(1-2):93-104.
- 桑田知宣. 「アユの科学と釣り」. 学報社. 2011.p158-164.
- 松浦秀俊・友保礼次郎・高橋勇夫. 「アユを育てる川仕事」. 築地書館. 2010.p124-132.
- アユ冷水病対策協議会. アユ冷水病防疫に関する指針. 2011.
- 高木優也・阿久津正浩・西村友宏. アユの重要疾病の発生メカニズムの研究. 平成30年度水産防疫対策委託事業(水産動物疾病のリスク評価)実施報告書. 2017. p8-14
- 高木優也・酒井忠幸. 解禁日における放流アユの回収率. 栃木県水産試験場研究報告 2018;61:40-41.

酒井忠幸・武田維倫(栃木水試)

魚類防疫技術書

アユの細菌性冷水病

令和2年3月

公益社団法人 日本水産資源保護協会

〒104-0044 東京都中央区明石町 1-1
東和明石ビル 5F

Tel: 03-6680-4277 FAX: 03-6680-4128