

# 健全な内水面生態系復元等推進委託事業

## - 放流効果及び漁業実態調査 -

湯浅明彦・竹内 章

平成17年度の調査では人工種苗の放流が多い海部川の中・上流域でアユ漁解禁直後（6月上旬）から冷水病の発病が確認された。冷水病の主な感染源として、おとりアユと釣り人の河川への侵入が考えられた。冷水病原因菌はアユの発病期（6～7月及び11～12月の産卵期）に培養法とPCR法で検出された。また、発病期以外にもアユ漁解禁前の4月下旬から5月に河床の付着藻類からPCR法でアユ型（AS型）冷水病原因菌が検出された。これらの調査結果から、おとりアユや釣り人とともに河川に侵入した冷水病原因菌は、長期継代により耐病性が低下した人工種苗に感染し発病することで増殖し、河川環境中にまん延することが考えられた。そこで今年度は、冷水病の病原巢の可能性のある河床の付着藻類から冷水病原因菌を分離し、アユに対する病原性を明らかにする。また、栽培漁業センターで長期間継代飼育された人工種苗の冷水病に対する耐病性の低下を明らかにするために、河川遡上魚を養成した親魚から採卵飼育したF1種苗と耐病性を比較検討する。

### 材料と方法

#### 1 アユの釣獲実態と冷水病の発生状況

調査対象河川（海部川）のアユの釣獲実態と冷水病の発生状況について、アユ資源の管理団体である海部川漁業協同組合（第5種共同漁業権者）から聞き取りを行った。また、漁場監視員に依頼して、漁場別に遊漁者から聞き取った釣獲尾数や時間を日誌に記帳してもらった。

#### 2 河川等で採捕したアユの冷水病保菌検査

採捕した健康な稚仔魚は、鰓及び魚体の洗浄液を濃縮して検査試料とした。また、9月以降の性成熟期には、臓器から冷水病原因菌を培地に分離した。濃縮洗浄液からChelex法（蒸留水にChelex100を5%添加した溶液を使用）でDNAを抽出するとともに、Tobramycinを5ppm添加した改変サイトファーガ液体培地で増菌した後に改変サイトファーガ寒天培地に塗抹して菌分離を行った。分離方法は以下のとおりであるが、9月以降の鰓からの細菌分離は、直接寒天平板培地に塗抹して行った。また、抽出したDNAから、PPIC遺伝子を標的としたPCR法により冷水病原因菌の特異的な遺伝子配列の検出を行った。

#### 鰓洗浄濃縮液の作成方法と冷水病原因菌の分離方法

- 1) 試料に1mlのPBS(-)又は滅菌水道水を加え、30秒間攪拌する
- 2) 遠心分離（500G，4℃，10分）
- 3) 上清をマイクロチューブに移す
- 4) 遠心分離（10000G，4℃，15分）
- 5) 上清を捨てる
- 6) 沈殿物を50µlのPBS(-)又は滅菌水道水に懸濁する（10µLをDNA抽出に用いる）
- 7) 10µLをTobramycinを5ppm添加した改変サイトファーガ液体培地500µLで培養（増菌：16℃，3～4日間）
- 8) 改変サイトファーガ寒天培地に塗抹する（菌分離）

#### 3 河川環境中の冷水病菌の検出

付着藻類は調査地点につき1個又は数個の河床の石を滅菌した不織ガーゼで拭い、滅菌水道水が10mL入った遠流管に収容した。緑藻についても適量を同様に収容した。その後、研究室に保冷して持ち帰り、良く攪拌して1mLを分取し前述の方法で濃縮し、増菌した後に菌分離を行った。

Chelex法でDNAを抽出し、兵庫県立水産技術センターが開発したPPIC遺伝子を標的としたnested PCR法により特異的な遺伝子配列の検出を行った。河川水は1000mLを0.45µmのメンブレンフィルターで吸引ろ過した。そのフィルターを滅菌水道水1.8mL中でよく攪拌した懸濁液

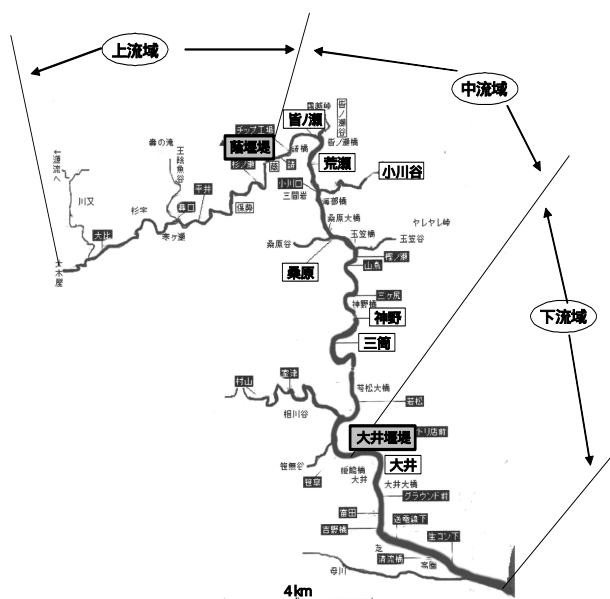


図1 海部川の調査水域図

を、前述の方法の4以下で処理した（洗浄法）。また一部の試料については二分割したフィルターの一部を、試薬内（DNAzol, インビトロジェン製）でホモジナイズして直接DNAを抽出した（直接法）。12月5日には冷水病原菌を分離するために、3種類の寒天培地（TYFBS：牛胎児血清添加トリプトン・イーストエキス培地, MCY：改変サイトファーガ培地, 5ppm Tobramycin添加改変サイトファーガ培地）に、濃縮前の懸濁液を滅菌水道水で3段階（等倍, 10倍, 100倍）に希釈したものを白金耳で塗抹した。

#### 4 F1種苗と継代種苗の冷水病に対する耐病性の比較

##### 1) 同居感染試験

徳島県栽培漁業センターで16代継代して飼育している人工種苗（平均体重3.9g, 以下継代魚）と平成17年4月に採捕した遡上稚魚を養成したものを親魚とする人工種苗（平均体重6.4g, 以下F1）各50尾を水槽（D1.0m × W 0.5m × H 0.5m, 実効水量150L）に収容した。系統を識別するために、尾鰭と胸鰭の一部を切除した。6月21日に海部川大井堰で採捕した稚アユ（平均体重10.1g）60尾を同水槽に収容した。26尾の横列鱗数を計数した結果、採捕した稚アユには放流魚が12%混入していた。水槽に塩素を除去した水道水を注水し、冷水病の発病を促進するために飼育水を18

に冷却し、7月7日から8月17日まで飼育した。発病が確認された8月8日まで、総魚体重の2%に相当する配合飼料を土日を除く毎日給餌した。

##### 2) 皮下注射法による攻撃試験と半数致死接種量（LD<sub>50</sub>）の測定

攻撃試験には皮下注射法による魚体通過を2回実施したPH0424株（養殖研究所から譲渡）を用いた。-80℃で凍結保存した菌株をMCY液体培地で吸光度0.45まで培養した後、菌体を遠心分離し、滅菌水道水で4段階の濃度に希釈した。継代魚とF1魚各20尾を試験魚とし、それぞれの系統で試験区を4区設けた。調整した菌液をFA100で麻酔した試験魚の背鰭基部の皮下に、皮下注射針を装着した分注器で30μLずつ接種した。対照区は、継代魚20尾に菌体の希釈に用いた滅菌水道水のみを接種した。1尾当たりの接種菌量は、多いものから1.5 × 10<sup>7</sup>, 1.5 × 10<sup>6</sup>, 1.5 × 10<sup>5</sup>, 1.5 × 10<sup>4</sup>CFUであった。飼育水温を17~18℃に冷却して14日間飼育し、死亡魚を計数して累積死亡率を求めた。各試験区の累積死亡率から、系統別のLD<sub>50</sub>をプロビット法で計算した。

## 結果

### 1 アユの釣獲実態と冷水病の発生状況

今年度のアユ種苗の放流尾数は、継代魚とともにF1を放流したために近年で最も多くなった（表1）。漁協の中間育成施設では施設稼働後初めて冷水病が発病し、飼育していた継代種苗の約20%が死亡した。投薬による治療により

放流までに冷水病は終息し、症状を示すものや活力の低下した病魚は見られなくなった。放流魚60尾の鰓を培養法で検査したが冷水病菌は検出されなかった。今年アユの遡上が遅くアユ漁解禁（6月1日）後しばらくは、放流量の多い上流域と一部支流（相川）が友釣り漁場として利用された。昨年（H17）は6月上旬の友釣りの釣獲尾数、CPUEともに良好であったが上流域では6月下旬以降（図2）、中流域では中旬以降急減した（図3）。今年上流域で6月中旬に友釣りの釣獲尾数が減少したが7月中旬までCPUEの低下は緩やかであり（図2）、中流域では8月上旬に好漁であった（図3）。昨年は冷水病がアユ漁解禁直後から中流域で発病し、6月中旬から下旬には上流域で死亡魚が比較的多く見られた。今年7月上旬に釣り人が多い上流域（大比）や一部支流で発生が確認されたが、死亡魚は少なく病勢は弱かった。

表1 海部川のアユ種苗放流量

年度	種苗	放流量(kg)	平均体重(g)	推定放流尾数
H18	人工F1	590	0.8~8.0	514,000
	人工継代	4,875	7.0	709,000
H17	人工継代	5,445	7.7	707,000
H16	人工継代	5,453	8.9	614,000
H15	人工継代	3,280	8.1	405,000

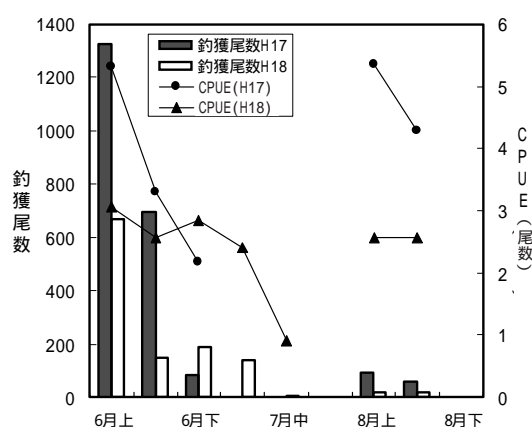


図2 上流域の友釣りの旬別CPUEと釣獲尾数の年次比較

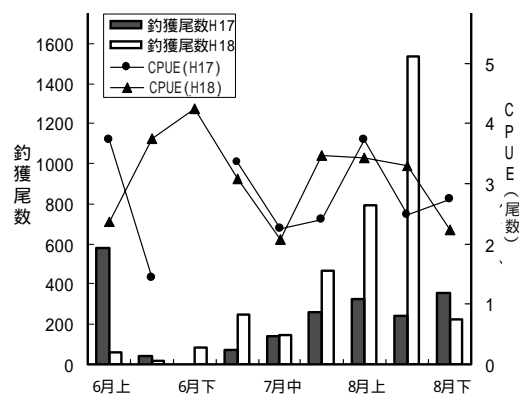


図3 中流域の友釣りの旬別CPUEと釣獲尾数の年次比較

## 2 河川等で採捕したアユの冷水病保菌検査（表2）

4月19日に海部川河口から北に約22km離れた砂浜海岸で採捕した遡上前の稚アユ及びアユ漁解禁前の4月20日に海部川大井堰で採捕した稚アユから冷水病原菌は分離されなかった。9月までの鰓洗浄濃縮液のPCR試料は標的DNAの汚染（contamination）により陽性を示した。解禁後9月下旬までの間に鰓から菌分離を3回実施したが、冷水病原菌は増殖しなかった。10月17日に鰓から冷水病原菌が検出されたが、腎臓などの臓器から検出されなかった。採捕した54尾のアユのGSIは平均4.8であり、生殖腺の発達したのが見られた。11月7日には更に成熟が進み、生殖腺は中流域で採捕したものが下流域より発達していた。冷水病原菌は鰓と腎臓から分離されたが、生殖腺から分離されることはなかった。7月4日と11月7日に採捕された死亡魚は全て放流魚であったが、12月の死亡魚は成熟した海産遡上魚であった。鰓洗浄濃縮液をTobramycinを5ppm添加した改変サイトファーガ液体培地で培養したが、ほとんどの場合冷水病以外の細菌がほぼ純粋に増殖した。この方法では冷水病原菌を選択的に増菌することはできないと考えられたので、9月以降は寒天平板に直接塗抹して菌分離を行った。

## 3 河川環境中の冷水病菌の検出

アユ漁解禁前に3回、13地点で付着藻類（珪藻及び緑藻）を採取して培養法とPCR法で冷水病の検出を試みたが培養法は全て陰性であった。DNAの抽出過程でcontaminationが起こり、PCR法による判定ができなかった。試料を冷凍保存してあった6月6日と7月27日の検体については、DNAを再抽出して検査したところいずれも陰性であった（表3）。

表2 採集したアユおよび死亡魚の冷水病保菌検査結果

採集月日	採集場所	培法（陽性数/検体数）			PCR法 <sup>4)</sup> （陽性数/検体数）	備考	
		鰓	腎臓 <sup>2)</sup>	その他 <sup>2)</sup>		放流魚の比率%	GSI
4月19日	砂浜海岸			0/18（魚体 <sup>3)</sup> ）	NT		沿岸生活期
4月20日	下流（大井堰）	0/30 <sup>1)</sup>			NT	37%	
6月21日	下流（大井堰）	0/23 <sup>1)</sup>			NT	12%	
8月7日	中流（三筒）	0/20 <sup>1)</sup>			NT	28%	
9月26日	支流（小川谷）	0/48 <sup>2)</sup>	0/48		NT	54%	2.9
10月17日	下流（大井堰）	1/49 <sup>3)</sup>	0/54	0/54（生殖腺）	2/18（54 <sup>5)</sup> ）	33%	4.8
11月7日	中流（蔭堰堤下）	2/60 <sup>3)</sup>	1/60	0/60（生殖腺）	2/20（60）	33%	13.3
	下流（鉄橋下）	0/60 <sup>3)</sup>	1/60	0/60（生殖腺）	4/20（60）	8%	8.6
7月4日	上流（大比）		3/4	3/4（顎 <sup>3)</sup> ）	3/4（4）	100%	死亡魚
11月7日	下流（高園）	1/1 <sup>3)</sup>	1/1	1/1（生殖腺）		100%	死亡魚
12月5日	下流（鉄橋下）		4/6	4/6（生殖腺）	6/6（6）	0%	死亡魚

- 1) Tobramycinを5ppm添加したMCY液体培地で増菌後MCY寒天培地に塗抹
- 2) MCY寒天培地に塗抹
- 3) Tobramycinを5ppm添加したMCY寒天培地に塗抹
- 4) 鰓洗浄濃縮液からDNAを抽出し、PPIC遺伝子を標的としたPCR法で実施
- 5) 括弧の数字は検査した尾数

アユが成熟する11月以降に成熟魚から排菌された冷水病原菌の動態を明らかにするために、産卵場周辺の調査を実施した（表4）。11月7日には下流の産卵場で付着藻類がPCR検査で陽性を示し、12月5日に1Lの河川水をろ過したフィルター上の洗浄水がPCR検査で陽性を示し、Tobramycin 5ppm添加改変サイトファーガ培地で冷水病原菌が分離された。12月19日に同様の方法で行った河川水の検査は陰性であった。12月26日に1Lの河川水を濾過したフィルターから直接DNAを抽出する方法で検査したところ、7検体中の2検体が陽性を示した。1月22日には付着藻類と河川水のいずれも陰性であった。

## 4 F1と継代魚の冷水病に対する耐病性の比較

### 1) 同居感染試験

海部川で採捕した遡上稚アユは頻りに飛び跳ね行動を示し、遮蔽が不完全であったため約40尾（収容魚の67%）が飛び出しにより死亡した。同様に継代魚では5尾（10%）、F1では8尾（13%）が飛び出しにより死亡した。冷水病は飼育水を18℃に冷却して34日後に発病が確認された。その後15日間で継代魚の66%、F1の28%が冷水病により死亡した（図4）。43日後に生残魚の腎臓から細菌を分離した結果、継代魚の90%から冷水病原菌が分離されたが、F1からは分離されなかった。

### 2) 皮下注射法による攻撃試験と半数致死接種量（LD<sub>50</sub>）の測定

14日後の累積死亡率は接種菌量の多い試験区の順に、継代魚で95%、85%、60%、40%、F1では85%、70%、35%、35%であった。プロビット法でLD<sub>50</sub>を計算した結果、継代魚は4.4 × 10<sup>4</sup> CFU、F1では2.0 × 10<sup>5</sup> CFUであった。

表3 河川環境中の冷水病菌の検出

採集月日	採集場所	水温 ( )	試料	培法	PCR法 <sup>2)</sup>
5月2日	支流 (小川谷)	11.5	付着藻類	-	NT
	中流域 (桑原口)	15.5	付着藻類	-	NT
	支流 (相川)	16.0	付着藻類	-	NT
5月22日	中流域 (桑原)	16.8	付着藻類	-	NT
	中流域 (神野)	17.2	付着藻類	-	NT
	中流域 (大井)	17.8	付着藻類	-	NT
	上流域 (杉の瀬)	16.7	付着藻類	-	NT
	支流 (相川村山)	18.3	付着藻類	-	NT
5月25日	下流域 (清流橋)	16.5	付着藻類	-	NT
	下流域 (大井大橋)	16.5	付着藻類	-	NT
	中流域 (若松)	16.6	付着藻類	-	NT
	支流 (小川谷上)	16.0	付着藻類	-	NT
	支流 (小川谷下)	16.2	付着藻類 緑藻	-	NT NT
6月6日	上流域 (大比上)		付着藻類 緑藻	-	-
	上流域 (大比下)		付着藻類	-	-
	支流 (小川谷口)		付着藻類 緑藻	-	-
	中流域 (桑原)		付着藻類	-	-
	下流域 (大井堰)		付着藻類	-	-
6月21日	支流 (相川大地)	19.2	付着藻類 緑藻	-	NT NT
	中流域 (桑原)	19.5	付着藻類	-	NT
	支流 (小川谷口)	18.7	付着藻類	-	NT
7月27日	上流域 (大比上)	22.1	付着藻類	-	-
	支流 (小川谷上)	21.1	付着藻類	-	-
	支流 (小川谷下)		付着藻類	-	-
	中流域 (桑原)		付着藻類	-	-
				付着藻類	-
10月17日	中流域 (大井堰)		付着藻類	NT <sup>1)</sup>	-
			付着藻類	NT	-
			付着藻類	NT	-

1) 未検査

2) PPIC遺伝子を標的としたnestedPCR法で実施

表4 アユ産卵場周辺の冷水病原菌の検出

採集月日	採集場所	水温 ( )	試料	培法	PCR法
11月7日	中流域 (大井堰)	14.9	付着藻類	NT	-
		15.0	付着藻類	NT	-
	下流域 (高園)	20.3	付着藻類	NT	-
	下流域 (鉄橋下)	19.3	付着藻類	NT	-
12月5日	中流域 (蔭堰堤下)	10.2	付着藻類 河川水	-	-
				-	-
	中流域 (桑原)	12.4	付着藻類	-	-
	中流域 (三筒)	14.9	付着藻類	-	-
	中流域 (大井堰)	16.2	付着藻類	-	-
	下流域 (鉄橋下)	17.0	付着藻類	-	-
12月19日	下流域 (産卵場周辺7地点)	17.0	付着藻類	-	-
		~ 18.3	河川水	-	-
12月26日	下流域 (産卵場周辺7地点)	15.6	河川水	-	-
		~ 16.9			
1月22日	下流域 (産卵場周辺3地点)	14.6	付着藻類	NT	-
		~ 15.2	河川水	NT	-

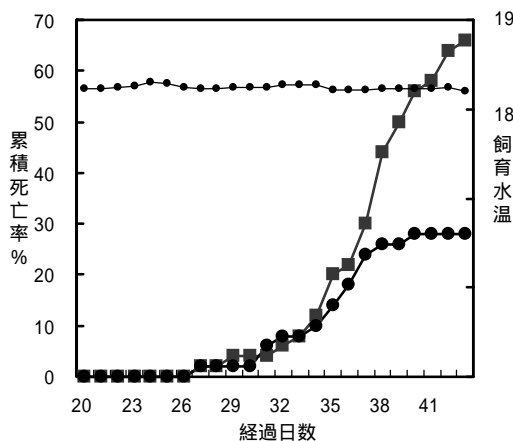


図4 同居感染による死亡率の推移  
 ■ 継代魚 ● F1 ● 飼育水温

このことから、F1種苗の冷水病に対する耐病性は継代種苗より強い(LD<sub>50</sub>値で4.5倍)ことが明らかになった(図5, 図6)。

### 考察

平成18年海部川のアユの放流尾数は近年で最も多かったが、下流域に放流されたF1は平均体重が0.8gの稚魚であり放流後の生残率は低いことが考えられる。アユ漁解禁後に友釣りが河川の一部の水域だけを利用したのは、海産アユの遡上が遅れたことと遡上量が昨年より少なかったことが原因と考えられる。図2, 図3に示した友釣りの釣獲尾数は漁場監視員の日誌から推計したものだが、日誌に記載された釣人数は実際の釣人数より少ないことから傾向を示す指標と考えるべきである。上流域では天然遡上魚が少なく初期資源量が少いために、解禁後CPUEと漁獲尾数が急減したと考えられる。一方、中流域では解禁後の釣獲尾数こそ少ないが、その後のアユ資源の補給により7月以降に釣獲尾数が増加している。平成17年は中流域で冷水病によるアユの死亡が多かったことが、6月中下旬に友釣りが不漁になった原因と考えられる。

成熟期前の健康なアユが冷水病に感染していれば、微量

の原因菌が鰓や体表に付着していることが考えられる。この微量な冷水病菌を検出するために、Tobramycinを5ppm添加したMCY液体培地で鰓の洗浄濃縮液から原因菌を選択的に増菌する方法を検討した。しかし、冷水病原因菌以外のTobramycin耐性菌が増殖したために冷水病菌を分離することはできなかった。病魚から冷水病原因菌をMCY寒天平板培地で分離する場合にはTobramycinを添加することが有効であるが、液体培地では競合する耐性菌が存在する場合には冷水病菌の増殖が阻害されることが考えられる。しかし、成熟親魚が発病し冷水病原因菌を排菌している産卵場の河川水から3種類の培地の中でTobramycin添加MCY培地だけから冷水病原因菌を分離することができたことは、同培地が優れた選択培地であることを示している。鰓の洗浄濃縮液からDNAを抽出する過程で発生したcontaminationはChelex法でDNAを抽出する過程で起こったことが明らかになったが、直接的な原因を明らかにすることはできなかった。その後、マイクロチューブの蓋の開閉やマイクロピペットの慎重な操作と、検査室の清掃を徹底することでcontaminationを防止することができるようになった。

7月の月上旬と秋の成熟期に冷水病原因菌が検出及び分離されたことは昨年と同じ傾向であり、7月の発病を経て感染率が高まり、成熟にともなう免疫の低下により発病するというサイクルを示したものである。昨年は4月から河川環境中から原因菌がPCR法で検出されたが、今年は11月まで検出されなかった。6月までのPCR検査は技術上の問題があったが、培養法でも検出されなかったことは冷水病の発病水域が限定されていたことと病勢が弱かったことが影響していると考えられる。河床の石の付着藻類については、同様の検査を実施した機関で結果に違いがあり、試料の採取や処理の方法に起因する可能性があることから今後の検討が必要である。

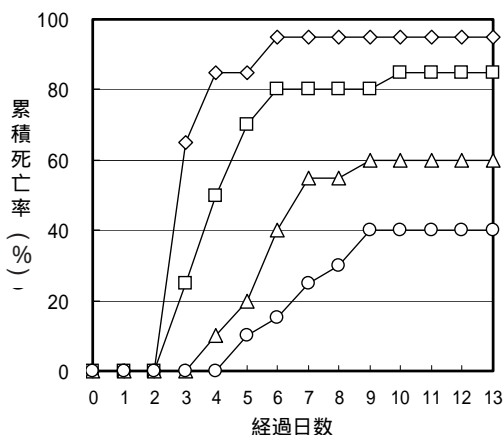


図5 継代魚に対する皮下注射攻撃試験結果

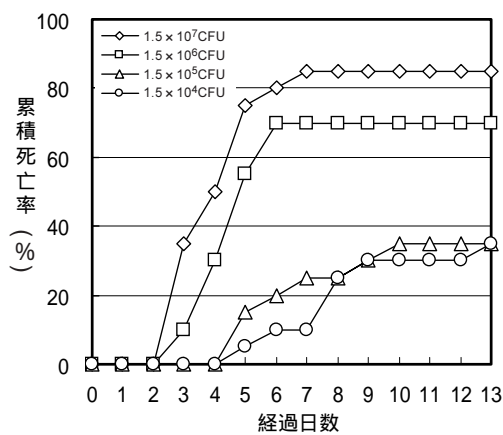


図6 F1に対する皮下注射攻撃試験結果