

## 富山県の河川で採捕されたアユにおける冷水病原菌検出頻度の季節変化

村木 誠一・田子 泰彦

(2003年10月23日受理)

### Seasonal Changes in Detection Rate of *Flavobacterium psychrophilum* in the Ayu (*Plecoglossus altivelis*) in Rivers of Toyama Prefecture

Seiichi MURAKI \*, Yasuhiko TAGO \*

Wild ayu (*Plecoglossus altivelis*) at various life stages were tested for *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of the coldwater disease, using either nested PCR or modified cytophaga agar. The fish were caught in twelve rivers in Toyama Prefecture from 2000 to 2003. *F. psychrophilum* was not detected among larvae, but detected in juveniles sampled in April to the middle of July. The bacteria were not detected during mid-summer and became detectable in the sexually mature adults in September and October. These results suggest that vertical transmission of the bacteria is unlikely and that the fish are infected after they enter into rivers. The results also suggest that the activity of the bacteria is suppressed during summer months probably due to high water temperature.

Key words: Ayu, *Flavobacterium psychrophilum*, nested PCR, *Plecoglossus altivelis*, Toyama Prefecture

近年、アユ (*Plecoglossus altivelis*) において、冷水病が全国的に大きな被害をもたらす問題となっている。アユの冷水病は、1987年に徳島県の養殖場で初めて発生が確認され (若林ら 1992)、その後各地の養殖場ばかりでなく、河川においても発生が確認されるようになり、2000年には25都道府県、65地域で冷水病の発生が確認されている (アユ冷水病対策研究会, 水産庁 2001a)。富山県においても1996年に初めて河川で放流魚と推定されるアユで冷水病の発生が確認され、その後、1999年には、4月および5月の河川のアユ、中間育成場のアユから冷水病原菌 (*Flavobacterium psychrophilum*; 以下、冷水病菌とする) が検出されている (大津 1999)。今後、冷水病の被害を軽減するためには、富山県内における冷水病の実態を把握することが重要と考えられる。そこで、本研究はこれまで行っていないアユ降下仔魚 (以下、降下仔魚とする)、アユ海産遡上稚魚 (以下、遡上稚魚とする) についての冷水病保菌状況、遡上時期から産卵時期までの冷水病菌の分布状況を明らかにするために、2000年から2003年にかけて、庄川を中心とした県内の河川において冷水病調査を実施した。

---

\* 富山県水産試験場 (Toyama Prefectural Fisheries Research Institute, Namerikawa, Toyama 936-8536, Japan)  
富山県水産試験場業績A15第2号

## 材料および方法

**供試魚** 2001年10月, 2002年10・11月および2003年10月に, 庄川下流域(河口から5.5km)で仔魚ネット(口径45cm, 網目の大きさ0.3mm)を用いて降下中のアユ仔魚を採集した。また, 庄川河口域でタモ網を用いて仔魚(以下, 河口域仔魚とする)を採捕した。採集した仔魚は直ちに80%アルコールに浸漬し保存した。また, 2000年5月に黒部川および神通川で, 2001年4・5月に庄川, 神通川を中心とした県内12河川(小川, 笹川, 黒部川, 角川, 片貝川, 早月川, 白岩川, 上市川, 常願時川および小矢部川)で, 2002年5月および2003年4・5月に庄川で, それぞれ投網を用いてアユ遡上稚魚を採捕した。さらに, 庄川または神通川において, 2000年から2003年の6月から10月にかけてアユを投網またはてんから網を用いて採捕した。

**冷水病菌の検出方法** (1)PCR法 アユ(稚魚, 成魚)は各個体から鰓および腎臓の一部を採取し, 2~3個体を1検体とした。降下仔魚については, 10個体を1検体とし仔魚全体をホモジナイ

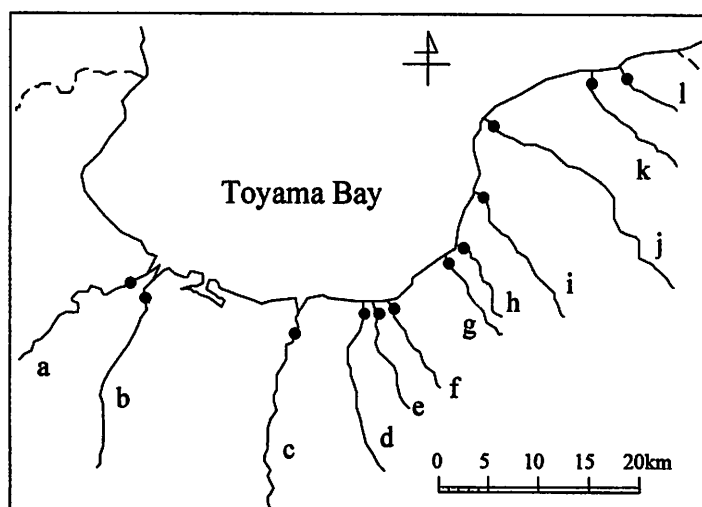


Fig. 1 Map showing rivers where samples were caught in Toyama Prefecture.

a:Oyabe River, b:Shou River, c:Jinzu River, d:Joganji River, e:Shiraiwa River, f:Kamiichi River, g:Hayatuki River, h:Kado River, i:Katakai River, j:Kurobe River, k:O River, l:Sasa River.

ズして用いた。河口域仔魚については, 1個体を1検体とし腎臓を含む躯幹部を検査に用いた。

DNAの抽出方法はChelex100(シグマ社製)を用いたキレックス法とし, 抽出したDNAをPCRの鋳型とした。PCRはnested PCRとし, 用いたプライマーおよび反応条件はIzumi and Wakabayashi(1997)に従った。

(2)培養法 白金耳を用いて各個体から鰓および腎臓の一部を採取し, 改変サイトファーガ寒天培地(トリプトン0.2%, イースト0.05%, 肉エキス0.02%, 酢酸ナトリウム0.02%, 塩化カルシウム0.02%, 寒天1.5%, 仔牛血清2.5% pH7.2)に塗抹後, 腎臓からの分離は18℃で7日間, 鰓からの分離は4℃で14日間培養し, 出現したコロニーをアユ抗血清を用いて凝集法にて判定した。凝集法で判定が困難な場合など, 必要に応じてPCRによる判定も行った。

**水温** 庄川の河川水温については, 庄川沿岸漁業協同組合連合会が測定したデータを旬ごとに平均し用いた。

## 結 果

降下仔魚の検査結果を Table 1 に示した。3ヶ年にわたり、降下仔魚については計702個体、河口域仔魚については計13個体を検査したが、冷水病菌は検出されなかった。

遡上稚魚については、2000年5月に神通川、2001年4月に神通川、5月に小川、角川、早月川、神通川および小矢部川で採捕した個体からは冷水病菌が検出されたが、2000年5月に黒部川、2001

Table1. Detection rate of *Flavobacterium psychrophilum* by nested PCR among ayu larvae.

Date of sampling	Sampling river	Numbers	Tested organ	Detection rate of <i>F.psychrophilum</i> *	
12 Oct. 2001	Shou River	105	Whole body	0	descending larvae
26 Oct. 2001	Shou River	97	Whole body	0	〃
9 Oct. 2002	Shou River	100	Whole body	0	〃
23 Oct. 2002	Shou River	100	Whole body	0	〃
9 Nov. 2002	Shou River	100	Whole body	0	〃
28 Nov. 2002	Shou River	100	Whole body	0	〃
20 Oct. 2003	Shou River	100	Whole body	0	〃
30 Nov. 2001	Shou River (river mouth)	3	Trunk with viscus	0	
28 Nov. 2002	Shou River (river mouth)	10	Trunk with viscus	0	

\* Detection rate=number of positive samples / number of samples examined ×100 (%)

年5月に笹川、黒部川、片貝川、白岩川、上市川、常願時川および庄川の7河川、2002・2003年に庄川で採捕した個体からは冷水病菌が検出されなかった。(Table 2)。

遡上のほぼ終わる6月以降の調査結果を Table 3 に示した。7月中旬までは冷水病菌が検出される個体が見られたが、7月下旬から8月下旬にかけては冷水病菌が検出されなくなった。その後、9月から10月にかけて、産卵期の親魚では冷水病菌が検出された。それらの親魚は体表の穴あき症状、下顎、胸鰭基部の出血等冷水病に特徴的な症状が見られた。

また、庄川における2000年から2003年の6月から10月の旬別平均水温の変化を Fig.2に示した。河川水温は7月下旬から20℃を超え、8月には25℃以上となり、9月以降低下し10月には20℃以下となった。ただ、2003年については河川水温が20℃以上となったのは8月上旬であり、その後もあまり上昇が見られなかった。

Table 2 . Detection rate of *Flavobacterium psychrophilum* among wild ayu juveniles.

Date of sampling	Sampling river	Numbers	Tested organ	Method	Detection rate * 1 of <i>F.psychrophilum</i>
10 May. 2000	Kurobe River	23	Kidney	PCR	0
16 May. 2000	Kurobe River	8	Kidney	PCR	0
22 May. 2000	Jinzu River	20	Kidney	PCR	40
17 Apr. 2001	Kurobe River	3	Kidney	PCR	0
25 Apr. 2001	Shou River	1	Kidney	PCR	0
	Jinzu River	20	Kidney	PCR	10
11 May. 2001	Shou River	20	Kidney	PCR	0
14 May. 2001	O River	20	Kidney	PCR	70.0
	Sasa River	20	Kidney	PCR	0
	Kurobe River	20	Kidney	PCR	0
	Kado River	20	Kidney	PCR	70
	Katakai River	20	Kidney	PCR	0
	Hayatsuki River	16	Kidney	PCR	37.5
	Siraiwa River	20	Kidney	PCR	0
	Kamiichi River	20	Kidney	PCR	0
	Joganji River	20	Kidney	PCR	0
15 May. 2001	Jinzu River	10	Kidney	PCR	0
	Shou River	20	Kidney	PCR	0
	Oyabe River	14	Kidney	PCR	14.3
17 May. 2001	Kurobe River	20	Kidney	PCR	0
13 May. 2002	Shou River	20	Kidney	Agar	0
23 May. 2002	Shou River	30	Kidney	Agar	0
14 April. 2003	Shou River	15	Kidney	Agar	0
15 May. 2003	Shou River	30	Kidney	Agar	0

\* Detection rate=number of positive samples / number of samples examined × 100 (%)

Table 3. Detection rate of *Flavobacterium psychrophilum* among ayu caught in river after June.

Date of sampling	Sampling river	Tested organ	Method	Detection rate * <sup>1</sup> of <i>F. psychrophilum</i>	
				kidney	Gill
29 Jun.2000	Shou River	Kidney	PCR	0 (0/20* <sup>2</sup> )	—
30 Jun. 2000	Jinzu River	Kidney	PCR	26.7 (4/15)	—
4 Jul. 2000	Jinzu River	Kidney	PCR	33.3 (4/12)	—
16 Jul. 2000	Jinzu River	Kidney	PCR	33.3 (4/12)	—
26 Jul. 2000	Jinzu River	Kidney	PCR	0 (0/20)	—
22 Aug. 2000	Jinzu River	Kidney	PCR	0 (0/20)	—
11 Oct. 2000	Shou River	Kidney	PCR	50 (10/20)	—
26 Oct. 2000	Shou River	Kidney	PCR	90 (9/10)	—
28 June. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	0 (0/20)	30 (6/20)
24 July. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	0 (0/19)	0 (0/19)
8 Aug. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	0 (0/20)	0 (0/20)
4 Sep. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	0 (0/20)	0 (0/20)
25 Sep. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	20 (4/20)	20 (4/20)
16 Oct. 2001	Jinzu River	Kidney & Gill	PCR	33.3 (6/18)	66.6 (12/18)
12 Oct. 2001	Shou River	Kidney & Gill	PCR	50 (10/20)	100 (20/20)
26 Oct. 2001	Shou River	Kidney & Gill	PCR	60 (12/20)	100 (16/16)
3 June. 2002	Shou River	Kidney & Gill	Agar	13.3 (4/30)	42.9 (12/28)
17 July. 2002	Shou River	Kidney & Gill	Agar	6.7 (2/30)	36.7 (11/30)
13 Aug. 2002	Shou River	Kidney & Gill	Agar	0 (0/30)	0 (0/30)
12 Sep. 2002	Shou River	Kidney & Gill	Agar	0 (0/30)	0 (0/30)
16 Oct. 2002	Shou River	Kidney & Gill	Agar	13.3 (4/30)	66.7 (20/30)
3 June. 2003	Shou River	Kidney & Gill	Agar	0 (0/30)	43.3 (13/30)
17 July. 2003	Shou River	Kidney & Gill	Agar	3.3 (1/30)	16.6 (5/30)
13 Aug. 2003	Shou River	Kidney & Gill	Agar	0 (0/30)	0 (0/30)
10 Sep. 2003	Shou River	Kidney & Gill	Agar	0 (0/16)	25 (4/16)
20 Oct. 2003	Shou River	Kidney & Gill	Agar	30 (9/30)	30 (9/30)

\*<sup>1</sup> Number of samples positive / number of samples examined ×100 (%)\*<sup>2</sup> Number of samples positive / number of samples examined

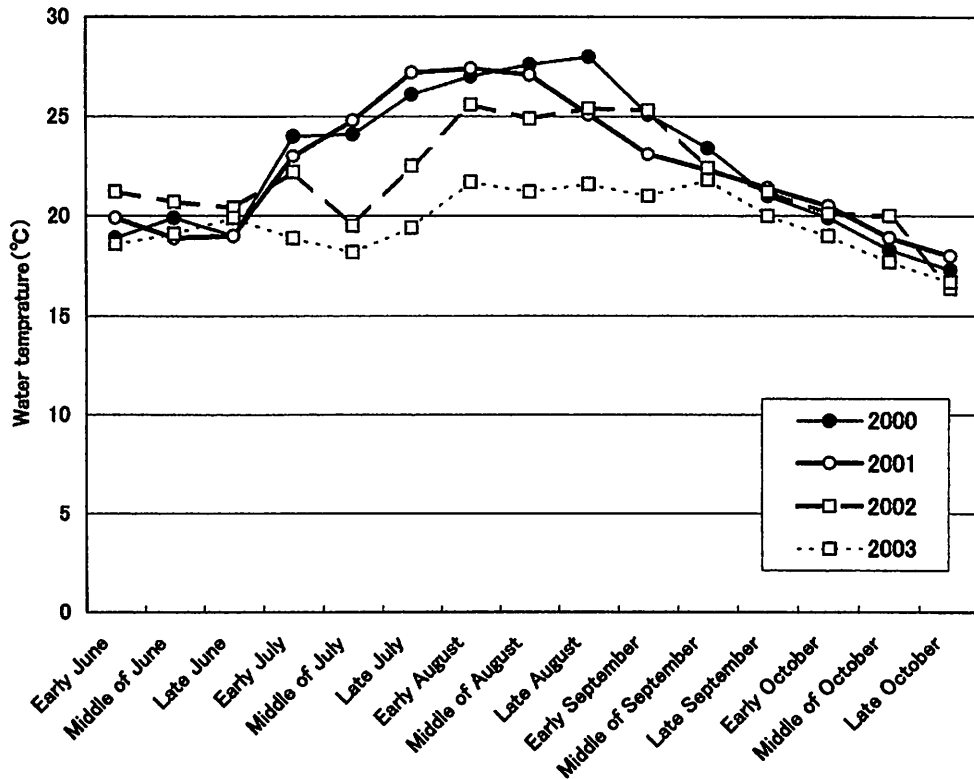


Fig.2 Change of average water temperature in Shou River from June to October

## 考 察

大津 (1999) が行った調査では、県内の河川で採捕したアユの鰓から冷水病菌が検出されており、県内に冷水病菌が拡がっていることが懸念されていたが、今回の調査で、県内でアユに冷水病が蔓延していることが明らかになった。

産卵親魚からは高い割合で冷水病菌が検出され、冷水病に特徴的な症状が見られたことから冷水病に感染・発病していたことは明らかであったのに対して、同じ河川で採捕した降下仔魚および河口域仔魚からは冷水病菌が検出されなかったことから、冷水病菌は卵を介しての垂直感染の可能性が低いと考えられる。

遡上稚魚については、2002年および2003年の庄川では冷水病菌が検出されなかったが、2001年の調査では、12河川のうち5河川の個体からは冷水病菌が検出されたことから、河川に遡上後比較的短い間に冷水病に感染することが示唆される。冷水病菌が検出された河川については、検査サンプルの採捕より以前にアユ種苗の放流が行われていたこと、また、アユ以外の魚種から冷水病菌が検出されている (村木 未発表) ことから、遡上稚魚はそれらの個体から感染した可能性が考えられる。このことに関しては、全国的にはオイカワ、アブラハヤ等21魚種で冷水病菌が検出されている (Iida and Mizokami 1996, アユ冷水病対策研究会・水産庁 2001b)。また、魚体からでなく河川水等から冷水病菌が検出されたという報告もある (網田ら 2000)。一方、冷水病菌

はギンザケ、アユ、ニジマスに由来する病原菌でそれぞれ異なる3つの血清型があることも報告されている（若林 1996, 若林・泉 2000）ため、今後冷水病感染経路についてさらに調査する必要がある。

アユの漁獲期間における冷水病菌の検出頻度を見てみると、6月から7月中旬にかけて冷水病菌が検出されたが、7月下旬から8月下旬には検出されなかった。その後、9月上旬以降になり採捕した産卵親魚は、冷水病に特徴的な症状を呈しており、多くの個体から冷水病菌が検出されるようになった。夏場は河川水温が上昇するため、冷水病菌の検出率が低くなることはこれまで報告されている（網田ら 2000, 久保田ら 2001）。本調査においても、夏場は河川水温が20℃以上に上昇しており（Fig.2）、水温の上昇により冷水病菌の増殖が抑えられ、河川水中の菌数、またはアユ魚体内の菌数が減少し、検出されにくくなったためと考えられる。また産卵親魚については、河川水温が低下し（Fig 2）、親魚が産卵のストレスや体力低下により冷水病に感染、発病しやすくなっていたのではないかと推測される。

以上のことから、アユは河川遡上後比較的早い時期に冷水病に感染し、保菌するようになるが、夏場は河川水温上昇のため菌の増殖が抑えられ、秋に河川水温が低下するとともに、産卵による体力や免疫力の低下により冷水病菌に感染・発病しやすくなることが示唆される。また、仔魚から冷水病菌が検出されなかったことから、親魚から卵を介しての垂直感染の可能性は低いと考えられる。

今後は、他魚種の冷水病の罹患状況、特に本県で重要な魚種であるサクラマス幼魚について調べるとともに、冷水病菌保菌魚種からアユへの感染、または冷水病保菌アユからその他の魚種への感染の可能性についても調査する必要がある。

## 謝 辞

本論文の御校閲を頂いた独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所病害防除部三輪理氏に感謝の意を表す。また、庄川の河川水温データを御提供頂いた庄川沿岸漁業協同組合連合会に御礼申し上げます。

## 文 献

- Kumagai A., S. Yamaoka, K. Takahashi, H. Fukuda and H. Wakabayashi 2000. Waterborne Transmission of *Flavobacterium psychrophilum* in Coho salmon Eggs. *Fish pathology*, **35** : 25-28.
- 網田健次郎・星野正邦・本間智晴・若林久嗣 2000. 河川における *Flavobacterium psychrophilum* の分布調査. *魚病研究*, **35** : 193-197.
- アユ冷水病対策研究会・水産庁 2001a. アユ冷水病対策研究会取りまとめ(1). 月刊養殖2001年9月号 : 77-80.
- アユ冷水病対策研究会・水産庁 2001b. アユ冷水病対策研究会取りまとめ(2). 月刊養殖 2001年10月号 : 111-115.
- 久保田仁志・糟谷浩一 2001. 天然水域におけるアユおよび在来魚の冷水病原因菌調査. 栃木県

水試研報, 44 : 24-25.

大津 順 1999. 富山県における冷水病菌の分布. P.21, 平成11年度富山県水産試験場研究発表  
会要旨集 P.21-23.

Izumi S. and H. Wakabayashi 1997. Use of PCR to detect *Cytophaga psychrophila* from Apparently  
Healthy Juvenile Ayu and Coho Salmon Eggs. *Fish Pathology*, 32 : 169-173.

若林久嗣 1996. 最近の魚病, 特に冷水病について. 広報ないすいめん 3 : 58-63.

若林久嗣・泉庄太郎2000. いろいろな魚類および地域から分離された冷水病原因菌  
*Flavobacterium psychrophilum* in の型別と分布. pp.7-13, アユの冷水病研究, 全国湖沼河川  
養殖研究会アユ冷水病部会.

若林久嗣・沢田健造・J.M.Bertolini・J.S.Rohovec 1992. アユの冷水病について. p.5, 平成4年  
度日本魚病学会春季大会講演集, 日本魚病学会.