

人工生産アユ数系統の冷水病感受性について

永井 崇 裕

Susceptibility to *Flavobacterium psychrophilum* in several hatchery stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*

Takahiro NAGAI

アユ *Plecoglossus altivelis* の冷水病は *Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌感染症で、1987年に徳島県の養殖場のアユ稚魚において初めて確認されて以来¹⁾、全国各地で発生が見られるようになった。この疾病は養殖場のみならず河川のアユにも蔓延し、河川漁業に深刻な影響を与えている²⁾。広島県では、1993年に西城川のアユおよびオイカワ *Zacco platypus* で発生したことが初めて確認され³⁾、それ以降多くの河川で毎年アユにおいて発生している。養殖場においては、スルフィソゾールの経口投与や加温治療、または両者の併用による治療が行われその有効性が示されているが⁴⁾、河川ではこれらの方法を用いることは不可能である。これらの方法に替わるものとしてワクチンの開発が国、関係県および大学等で行われている。これまでオイルアジュバント⁵⁾ や水溶性アジュバント^{6,7)} をホルマリン死菌に混合した注射ワクチンや、ホルマリン死菌を用いた経口ワクチン⁸⁾ の有効性が報告されているが、これらのワクチンが市販されるまでには至っていない。

筆者らは、広島県で生産されていた親魚の由来が異なる人工アユ3系統（海産交配系、湖産交配系および累代系）の冷水病感受性を感染実験によって比較した結果、海産アユに由来する海産交配系の死亡率が他の2系統と比較して大幅に低いことを明らかにした⁹⁾。県内では、これら3系統のアユ以外にも種々の系統のアユが生産されていることから、本研究では海産アユに由来する黒瀬川系、黒瀬高津川系および神通木曾川系アユについて冷水病感染実験を行ってその感受性を検討した。

材料と方法

供試魚 実験には広島県で人工生産されているアユ5系統（表1）を用いた。累代系は、1970年代初頭に太田川で捕獲されたアユを親として作られた系統で、これまで

継代飼育されていた。海産交配系は1997年に累代系のメスに鹿児島県産の海産アユのオスを交配させ作られた系統で、以後3年間連続して鹿児島県産の海産オスを交配させた後、継代飼育されていた。黒瀬川系は2001年に黒瀬川（呉市）で捕獲されたアユを親にして作られた系統で、以後毎年黒瀬川で捕獲されたオスを交配させていた。なお、黒瀬川系の生産は後述の黒瀬高津川系が作出されたため2004年で中止された。黒瀬高津川系は、2004年に黒瀬川系のメスに高津川（島根県）で捕獲されたオスを交配させて作られた。神通木曾川系は揖保川漁業協同組合（兵庫県）によって作出されたアユで、神通川（富山県）系のオスと木曾川（岐阜県）系のメスを交配させて作られており、2004年に受精卵が広島県に移入された。これらのアユは社団法人広島県栽培漁業協会によって生産され、水産海洋技術センターに輸送し淡水馴致してから実験に用いた。実験に供する前にこれらのアユに冷水病の発生や *F. psychrophilum* の保菌は確認されなかった。

表1 実験に用いたアユ系統

系 統	由 来
累 代 系	太田川捕獲アユ
海 産 交 配 系	累代系と鹿児島県産海産アユの交配
黒 瀬 川 系	黒瀬川捕獲アユ
黒瀬高津川系	黒瀬川系と高津川捕獲アユの交配
神通木曾川系	神通川系と木曾川系アユの交配

自然感染実験（野外実験） 河川水を用いてアユを飼育し冷水病を発病させる自然感染実験を2002年、2003年および2005年に行った。2002年および2003年には内水面実験地（庄原市）において実験を行い、供試魚として累代系（F28, 29）および黒瀬川系（F1, 2）を用いた。2005年には県内の養殖場において実験を行い、供試魚として累代系（F31）、海産交配系（F7）および神通木曾

川系（F1）を用いた。実験開始時の平均体重、水槽への収容尾数および収容密度は表2に示した。

内水面実験地での実験では、2002年は4月12日に2003年は4月15日にコンクリート製円形水槽（直径6.4m）にそれぞれの系統毎にアユを収容し、西城川から取水した河川水を用いての飼育を行った。試験期間中は市販の配合飼料を適量給餌して飼育するとともに、冷水病発生時には死亡魚を取り上げ計数した後、後述する方法により死因の確認をした。また、2005年の実験では5月11日に養殖場に供試魚を運搬した後、水内川から取水した河川水を用いての飼育を行った。供試魚は系統が判別できるように鰭切除標識を行った後、コンクリート製角形水槽（3×4m）で混養した。飼育方法については2002年および2003年の実験と同様であった。

同居感染実験（室内実験） 累代系（F29）および黒瀬川系（F2）を用いた実験1と、累代系（F31）、海産交配系（F7）、黒瀬高津川系（F1）および神通木曾川系（F1）を用いた実験2および実験3を行い、実験2および実験3では同様の試験区を2区設定し実験を行った。

冷水病の発病を確認し-80℃で冷凍保存していたアユ（10～20g）を感染源として用い、各系統のアユを収容した300L水槽に感染源のアユ（5～6尾）を24時間投入してから、紫外線処理脱塩素水道水を用い流水飼育し冷水病による死亡を観察した。実験1では14日間の観察を行い飼育期間中の水温は17.8℃から19.5℃で、実験2では21日間の観察を行い水温は14.9℃から15.7℃で、また実験3では20日間の観察を行い水温は15.9℃から16.9℃であった。なお、用いたアユの平均体重や供試尾数は表3に示した。

注射感染実験（室内実験） 累代系（F31）、海産交配系（F7）、黒瀬高津川系（F1）および神通木曾川系（F1）を用いた実験1と、海産交配系（F7）および黒瀬高津川系（F1）を用いた実験2を行った。

実験には、2002年に広島県内で採取した冷水病のアユから分離された *F. psychrophilum* PH-0215株を用いた。改変サイトファーガ培地¹⁰⁾を用い18℃で24時間培養したPH-0215株を、1 mg/mLとなるように生理食塩水で調整し、適宜希釈を行いアユの腹腔内に0.1mL接種した。接種後のアユは300L水槽に収容し、紫外線処理脱塩素水道水を用いて流水飼育し冷水病による死亡を観察した。実験1では13日間の観察を行い飼育期間中の水温は16.9℃から18.0℃であり、実験2では11日間の観察を行い水温は19.0℃から19.3℃であった。なお、1尾当たりの接種菌数や用いたアユの平均体重、供試尾数は表4に示した。

死因の確認および死亡率の比較 自然感染実験および同居感染実験の死因については、死亡した魚の症状の観察を行うとともに、一部は体表患部や腎臓の塗抹試料の間接蛍光抗体法を行い *F. psychrophilum* 抗原の有無を確認した。一次抗体として抗 *F. psychrophilum* PH-9304ウサギ血清³⁾をリン酸緩衝生理食塩水で100倍に希釈したものを、二次抗体としてFITC標識ウサギIgGヤギ血清（生化学工業）をリン酸緩衝生理食塩水で500倍に希釈したものをを用いた。また、注射感染実験の死因については、腎臓から改変サイトファーガ培地を用いて *F. psychrophilum* を再分離して確認した。

各系統の死亡率の差の検討は、Fisherの直接確率計数法により行い $P < 0.05$ を有意な差と見なした。

表2 冷水病自然感染実験

実験年	場 所	系 統	実 験 開 始 時			終了時 死亡率 %
			平均体重 g	収容尾数	収容密度 kg/m ³	
2002年	内水面実験地	累 代 系 (F28)	6.0	1,750	0.351	66.2
		黒 瀬 川 系 (F1)	3.4	3,060	0.346	65.4
2003年	内水面実験地	累 代 系 (F29)	5.1	2,500	0.425	95.0
		黒 瀬 川 系 (F2)	3.0	2,600	0.260	78.7
2005年	県内の養殖場	累 代 系 (F31)	7.2	200		73.0
		海 産 交 配 系 (F7)	7.4	200	0.723	49.0*
		神 通 木 曾 川 系 (F1)	7.1	200		39.2*

*：累代系の死亡率と有意な差

結 果

自然感染実験 2002年の実験の死亡経過を図1に示した。黒瀬川系では5月中旬から冷水病による死亡が増え始め、累代系では5月下旬から冷水病による死亡が急増した。両系統とも6月中旬までに大量死は終息し、7月上旬には冷水病の発生が見られなくなった。表2に示すように累積死亡率は累代系が66.2%，黒瀬川系が65.4%であり、冷水病発生時の水温は15.5℃から20.7℃であった。

2003年の実験の死亡経過を図2に示した。黒瀬川系では5月中旬から冷水病による死亡が増え始め、累代系では6月初旬から冷水病による死亡が増加した。両系統とも6月下旬までに大量死は終息し、7月上旬には冷水病

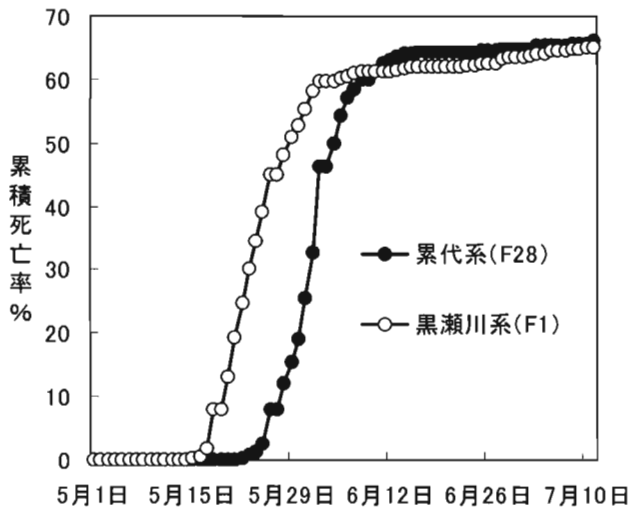


図1 河川水を用いた冷水病自然感染実験
(2002年, 内水面実験地)

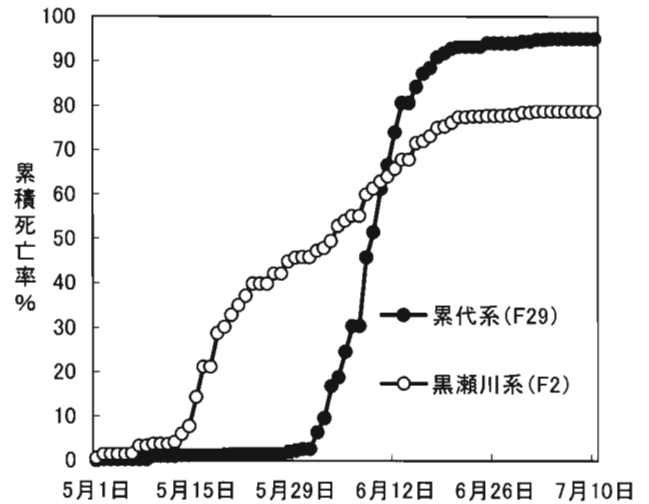


図2 河川水を用いた冷水病自然感染実験
(2003年, 内水面実験地)

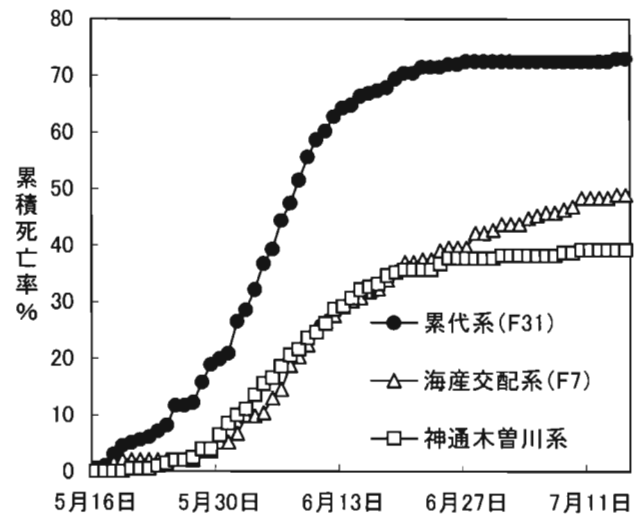


図3 河川水を用いた冷水病自然感染実験
(2005年, 県内の養殖場)

表3 冷水病死亡魚との同居感染実験

実 験	系 統	平均体重 g	供試尾数	死亡尾数	死亡率%
実験1*1	累 代 系	5.7	30	29	96.7
	黒 瀬 川 系	4.8	30	30	100
実験2*2	累 代 系	3.3	30	27	90.0
	試験区1	海産交配系	30	1	3.3*3
	神通木曾川系	3.1	30	5	16.7*3
	累 代 系	2.9	30	25	83.3
	試験区2	海産交配系	30	1	3.3*3
	神通木曾川系	2.8	30	3	10.0*3
実験3*2	累 代 系	5.1	30	24	80.0
	試験区1	海産交配系	30	2	6.7*3
	神通木曾川系	4.6	30	1	3.3*3
	黒瀬高津川系	2.7	30	7	23.3*3
	累 代 系	5.1	30	23	76.7
	試験区2	海産交配系	30	2	6.7*3
	神通木曾川系	4.9	30	3	10.0*3
	黒瀬高津川系	2.8	30	2	6.7*3

*1: 累代系 (F29), 黒瀬川系 (F2)

*2: 累代系 (F31), 海産交配系 (F7), 神通木曾川系 (F1), 黒瀬高津川系 (F1)

*3: 累代系の死亡率と有意な差

ユに由来する人工生産アユの冷水病感受性は全体的に低い傾向が見られるが、海産アユの一つと考えられる黒瀬川系の感受性が高かったことから、全ての海産アユが冷水病耐病性を有しているわけでないことも明らかとなった。

最近、ニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN) 耐病性に関連する染色体領域の一部分が、マイクロサテライト (MS) マーカーを用いた連鎖解析により同定されている¹¹⁾。アユの冷水病においても、耐病性に関連した MS マーカーの開発を行うとともに、感受性系統と耐病性系統の冷水病に対する生体防御能の違いについても検討する必要がある。

謝 辞

供試魚の提供等で協力頂いた社団法人広島県栽培漁業協会の職員の方々に深謝の意を表する。

文 献

- 1) 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.
- 2) 井上 潔 (2000): アユの冷水病. 海洋と生物, **126**, 35–38.
- 3) Iida, Y. and A. Mizokami (1996): Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157–164.
- 4) 若林久嗣 (2004): 細菌性冷水病. 魚介類の感染症・寄生虫病, 恒星社厚生閣, pp.177–183.
- 5) Rahman, M. H., M. Ototake, Y. Iida, Y. Yokomizo and T. Nakanishi (2000): Efficacy of oil-adjuvanted vaccine for coldwater disease in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **35**, 199–203.
- 6) 永井崇裕・飯田悦左・米司 隆 (2003): アユ冷水病に対する水溶性アジュバント添加ワクチンの野外試験. 魚病研究, **38**, 63–65.
- 7) Rahman, M. H., M. Ototake and T. Nakanishi (2003): Water-soluble adjuvants enhance the protective effect of *Flavobacterium psychrophilum* vaccines in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **38**, 171–176.
- 8) Kondo, M., K. Kawai, M. Okabe, N. Nakano and S. Oshima (2003): Efficacy of oral vaccine against bacterial coldwater disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**, 261–264.
- 9) Nagai, T., T. Tamura, Y. Iida and T. Yoneji (2004): Differences in susceptibility to *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathol.*, **39**, 159–164.
- 10) Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974): Characteristics of myxobacteria associated with some freshwater fish disease in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **40**, 751–757.
- 11) Khoo, S. K., A. Ozaki, F. Nakamura, T. Arakawa, S. Ishimoto, R. Nickolov, T. Sakamoto, T. Akutsu, M. Mochizuki, I. Denda and N. Okamoto (2004): Identification of a novel chromosomal region associated with infectious hematopoietic necrosis (IHV) resistance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathol.*, **39**, 95–101.