

淡水魚から分離された冷水病菌の遺伝子型

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

Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from freshwater fishes in Nagano prefecture

Masakazu Kohara, Yoshihiro Sawamoto, Sinji Kumakawa, Ikuo Denda
Motokazu Kawanobe, Shigeru Ogawa and Masami Tsukisaka

近年、長野県内の漁業協同組合は冷水病菌に汚染されていないアユ人工種苗を積極的に放流し、冷水病による被害の低減に努めている。河川のアユに冷水病が発生し始めた初期に比べると、最近では激しい死亡を伴う発生事例はほとんど見られなくなった。しかし、無病種苗を放流しても冷水病が発生したり、アユ種苗が放流されていない河川で発生した事例¹⁾もあるなど、アユ冷水病の伝播、発生機構については不明な点がある。

一方、アユや養殖サケ科魚類に発生する冷水病の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* は、いくつかの血清型²⁾ や遺伝子型^{3, 4)} に分けられることが報告されている。最近では、PCR-RFLP 解析による遺伝子型の判別手法を用いて、冷水病の伝播や河川における菌の分布に関する調査研究がなされている。

防疫対策を充実させるためには、流行菌の型判別や野生魚における菌の保有などに関する疫学情報の集積が有益であることから、2003～2007 年にかけて県内で分離した冷水病菌の遺伝子型を判別し、宿主魚種との関係や河川における動態について検討した。

なお、本研究は(独)水産総合研究センターから受託した「健全な内水面生態系復元等推進委託事業」に係る研究の一環として実施した。

材料と方法

冷水病菌株の収集

2003～2007 年に県内の河川に放流されるアユ種苗の保菌検査及び河川における発生調査において河川で採捕したアユとアユ以外の生息魚(以下「在来野生魚」と言う)並びに養殖サケ科魚類の魚病診断時に分離した冷水病菌 212 株(表 1)を判別に使用した。表 2 には供試株の分離部位を示した。

冷水病菌の分離、培養には、改変サイトファーガ寒天平板培地を用いた。分離された菌は、抗冷水病家兔血清((社)日本水産資源保護協会配布診断液)によるスライド凝集試験または間接蛍光抗体法を行って、陽性と判定された菌集落を 70～75%エチルアルコール

に懸濁させて保存した。なお、皮膚潰瘍部の菌分離において、雑菌繁殖のために菌分離が不調な場合には潰瘍組織の一部をアルコール固定して検体とした。

表 1 遺伝子型判別に使用した冷水病菌の由来と株数

調査年	魚 種	材料の採取事例	株数
2003	ア ユ	放流種苗の保菌検査	1
		河川の発生調査	8
2004	コイ(在来野生魚)	河川の発生調査	1
		河川の発生調査	12
2005	ア ユ ニジマス、イワナ (養殖サケ科魚類)	河川の発生調査	31
		魚病診断	5
2006	ア ユ ニジマス、ニジニジブラ* (養殖サケ科魚類)	放流種苗の保菌検査	25
		河川の発生調査	24
		魚病診断	18
2007	ア ユ ウグイ(在来野生魚) ニジマス、ヤマメ、ニジニジブラ* (養殖サケ科魚類)	放流種苗の保菌検査	17
		河川の発生調査	29
		養殖・蕃養の魚病診断	24
		河川の発生調査	4
		魚病診断	13
計			212

*全雌異質三倍体(ニジマス四倍体×ブラウントラウト)

表 2 冷水病菌の分離部位と株数

魚種	体表		内臓		
	皮膚潰瘍部	鰓	腎臓	肝臓	卵巣
ア ユ	43	63	48	1	4
コイ、フナ、ウグイ (在来野生魚)	9	7	1	0	0
ニジマス、イワナ、 ヤマメ、 ニジニジブラ* (養殖サケ科魚類)	4	4	28	0	0

*全雌異質三倍体(ニジマス四倍体×ブラウントラウト)

遺伝子型の判別

冷水病菌の遺伝子型は、PCR-RFLP 解析⁴⁾により行った。PCR で陽性と判定された反応試料を、Hinf I (インビトロジェン社)による制限酵素消化した後に電気泳動を行い、PCR 増幅産物の消化断片を確認して A、B 型の判別を行った。

PCR用のDNA試料は、アルコール固定した菌材料をもとに、インスタジーンDNA精製マトリクス（パイオ

ラド社）を用いたキレート樹脂抽出法で作製した。また、PCR反応液のポリメラーゼには、Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ社）を使用した。

表3 淡水魚から分離された冷水病菌株の遺伝子型

魚種	遺伝子型		計
	A	B	
アユ	137	22	159
在来野生魚			
コイ	0	8	8
フナ	0	2	2
ウグイ	0	7	7
在来野生魚計			17
養殖サケ科魚類			
ニジマス	0	19	19
イワナ	0	1	1
ヤマメ	0	3	3
ニジニジブラ*	0	13	13
養殖サケ科魚類計			36

*全雌異質三倍体（ニジマス四倍体×ブラウトラウト）

結果

冷水病菌の遺伝子型

冷水病菌の遺伝子型判別の結果を表3に示した。アユ由来の159株はA、Bの2型に判別され（図1）、このうちA型は137株で86%を占めた。これに対して、在来野生魚由来の17株と養殖サケ科魚類由来の36株はすべてB型に判別された。

河川における冷水病の発生と遺伝子型の調査例

2003～2004年に収集した冷水病菌株の遺伝子型の判別結果をもとに、塩尻市の奈良井川における冷水病の発生状況とアユ及び在来野生魚についての検査結果を図2に模式的にまとめた。

2003年5月に、県産の人工アユ種苗が放流されたが、保菌検査では陰性であった。その後アユ漁の解禁が近づいた6月下旬にアユ冷水病が発生し、分離菌の遺伝子型はA型であった。菌の侵入経路などの原因は不明であった。一方、アユが放流される前に同区域で行った在来野生魚の保菌検査では、コイ、ウグイ及びアブラハヤから冷水病菌が分離され、このうち遺伝子型を判別したコイ由来菌株はB型であった。

2004年においても、保菌検査が陰性であった県産の人工種苗が放流された。アユ漁の解禁直前に行われた試験釣り調査におけるアユの検査結果は陰性であり、その後アユ漁が解禁されたが冷水病の発生はなかった。一方、アユが放流される前に行った在来野生魚の保菌検査において、コイ、フナ及びウグイから分離された冷水病菌の遺伝子型はいずれもB型であった。アユ試験釣りの調査時に検査したウグイ、ヤマメは陰性であった。

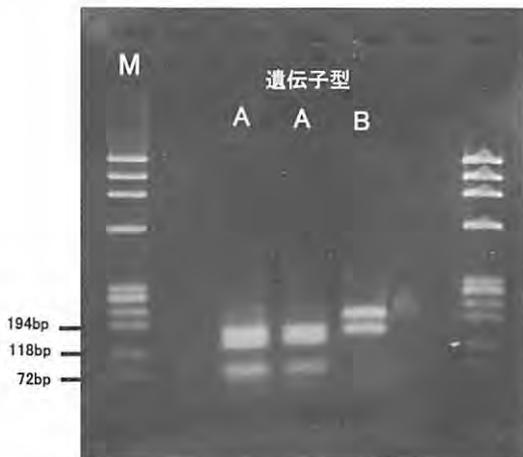


図1 制限酵素消化(Hinf I)したアユ由来菌株のPCR増幅産物電気泳動像

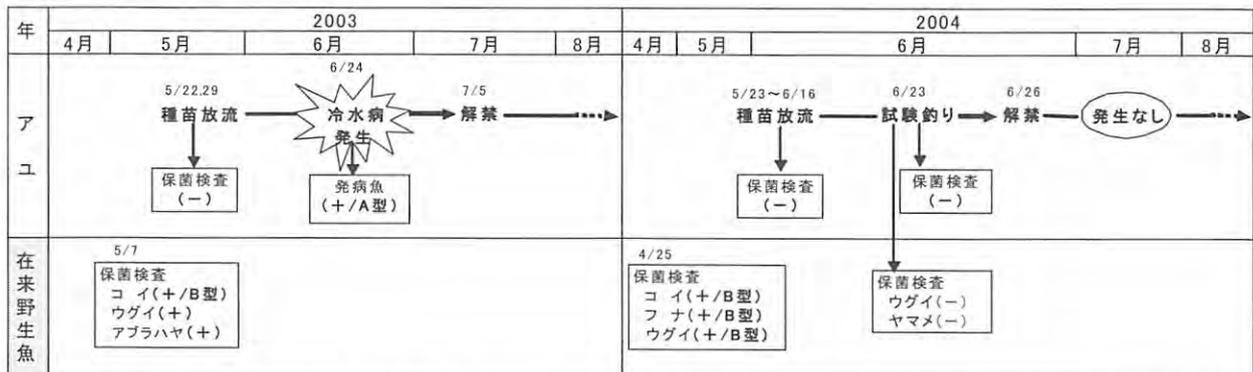


図2 塩尻市奈良井川における冷水病の発生とアユ及び在来野生魚から分離された冷水病菌の遺伝子型

県内から収集した冷水病菌の遺伝子型を判別したところ、A 型菌はアユからのみ分離され、しかもアユ由来株のほとんどを占めること、一方、B 型菌はアユをはじめ在来野生魚や養殖サケ科魚類から広く分離されることがわかった。この結果は、アユ冷水病の原因は A 型菌が主体であり、かつ在来野生魚由来の菌株には A 型がないとするこれまでの報告^{3, 4)}を支持する。一方、アユに病原性を有する B 型菌が分離された例もあるとされている¹⁾が、本研究において判別されたアユ B 型株のアユに対する病原性については不明である。

次に、アユ冷水病に対する在来野生魚の関与について、田畑⁵⁾は、オイカワから分離された B 型菌 (BS 型) は河川のアユ冷水病に関与していないことを報告している。奈良井川の調査事例からみても、2003 年に発生したアユ冷水病は A 型菌によるものであるのに対して、在来野生魚から分離された冷水病菌は B 型であることから、河川アユに冷水病が伝播した経路は、在来野生魚ではなく別であると考える。また、2004 年にも在来野生魚から B 型菌が分離されていることから、これらの魚が一時的に A 型菌を保有し、翌年のアユ冷水病の感染源として関与する可能性は低い。冷水病菌の血清型や遺伝子型にみられる宿主特異性と、自然河川におけるアユと在来野生魚の菌の保有状況からすれば、アユ冷水病はアユを介した経路で伝播し、発生すると考える。

一方、ワカサギ⁶⁾、オイカワ及びアカザ⁷⁾、越年アユ⁸⁾から A 型株が分離された事例も報告されている。これらの事例において分離菌の病原性などは検討されているが、分離された際の宿主の状態、菌の保有状況、あるいはその水域におけるアユ冷水病の発生状況などに関する情報が少ない。アユ冷水病の伝播、発生におけるこれら魚類の関与については、詳細な事例研究を踏まえて判断することが適当である。

河川で発生したアユ冷水病の中には、依然として原因が不明な事例もあるが、無病種苗を計画的に放流することにより高い放流効果が得られることが分かっている⁹⁾。まずは健全な種苗を放流し、その効果を高めるために、輸送から放流までの過程において基本的な防疫対策を実行することが必要である。また、近年では、アユ冷水病の発生時期がアユ漁の解禁以後に発生する事例が増えている¹⁾。この要因として冷水病菌に汚染された「おとりアユ」の販売、発生地域で釣ったいわゆる「野アユ」の持ち込み、釣り用具の汚染などの問題が疑われる。これら遊漁対策面における防疫技術の開発も重要な課題である。

- 1 県内のアユ、在来野生魚及び養殖サケ科魚類から分離した冷水病菌 212 株の遺伝子型を判別した。
- 2 アユ由来株は、A、B の 2 型に判別され、A 型菌が 86% を占めた。
- 3 在来野生魚及び養殖サケ科魚類由来菌の遺伝子型はすべて B 型に判別された。
- 4 河川で発生したアユ冷水病は A 型菌によるものであったが、在来野生魚から分離された菌株はすべて B 型であった。
- 5 冷水病菌の遺伝子型判別及び河川における調査事例から、アユ冷水病の伝播、発生に在来野生魚が関与する可能性は低く、無病種苗の放流、輸送及び放流時における防疫対策の実行が課題である。

文 献

- 1) アユ冷水病対策協議会 (2008) : アユ冷水病対策協議会とりまとめ, 1-9.
- 2) Izumi S., Wakabayashi H. (1999) : Further Study on Serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. 魚病研究 34 (2), 89-90.
- 3) Izumi S., Aranishi F., Wakabayashi H. (2003) : Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using RCR-RFLP analysis. Dis. Aquat. Org. 56, 207-214.
- 4) 吉浦康寿ら (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 (2), 67-71.
- 5) 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 (3), 318-323.
- 6) 菅原和宏・山本充孝 (2003) : *gysB* 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.
- 7) 新井肇ら (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 (4), 575-576.
- 8) 宮崎統五 (2008) : 越年アユから分離された細菌性冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum*. 魚病研究 43 (4), 167-169.
- 9) 川之辺素一・沢本良宏・山本聡 (2005) : 千曲川におけるアユの放流効果と冷水病の関係. 長野県水産試験場研究報告 (7), 10-15.