越冬アユから分離された 細菌性冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum*

宮崎統五

(2008年5月14日受付)

Flavobacterium psychrophilum Isolated from Overwintering Ayu *Plecoglossus altivelis*

Tougo Miyazaki

Fisheries Research Institute, Toyama Prefecture
Agricultural, Forestry and Fisheries Research
Center, Namerikawa, Toyama 936-8536,
Japan

(Received May 14, 2008)

ABSTRACT—Overwintering ayu *Plecoglossus altivelis* ($n = 23$) were captured in Sho-river, Toyama Prefecture in April, 2007, and kept under a crowded condition (120 g fish/L). When the fish became moribund or dead, bacteria were isolated from the kidney of the fish using a modified Cytophaga agar plate, and the isolates were examined by the PCR-RFLP method using primers targeting *gyrA*, *gyrB* and *PPIC* genes of *Flavobacterium psychrophilum*. The isolates obtained from nine individuals of the fish were identified as *F. psychrophilum* and classified into two genotypes of A/R/QR and A/S/QR. An isolate from each genotype was virulent to ayu. These results showed that overwintering ayu carry virulent *F. psychrophilum*, suggesting a source of infection for newcomers of ayu in this spring.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, *Plecoglossus altivelis*, carrier, bacterial cold water disease

アユ *Plecoglossus altivelis* の細菌性冷水病は、養殖場だけでなく、河川においても毎年発生がみられている。近年では、消毒された受精卵¹⁾ から生産されたアユが放流されているにもかかわらず、河川内では細菌性冷水病に罹患したアユが毎年みられていることから、病原体

キャリアが周年河川内に存在していることが疑われている。アユの多くは秋に産卵して死亡するため、冬期には河川でほとんど生息していないが、冬期の河川水および藻類から細菌性冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* の遺伝子が検出されている^{2,3)}。しかし、現在までのところ、冬期に河川環境や魚類から *F. Psychrophilum* が分離されたとの報告はない。

アユのうちの一部は未成熟のまま越冬する個体（越冬アユ）があることが知られており⁴⁾、これら越冬アユが *F. psychrophilum* のキャリアとして次世代のアユへの感染源になっている可能性が考えられる。本試験では、4月中旬に河川で越冬アユを採集し、それらから *F. psychrophilum* の分離を試み、分離菌のアユに対する病原性を調べた。

材料および方法

富山県内を流下する庄川の河口から上流約 10 km の河川敷に、10°C の伏流水が湧出する水域（末端は庄川本流へ合流する）があり、そこで生息していたアユ23尾（平均体重±標準偏差：10.5±2.5 g、体重の範囲：6.7～16.1 g）を採集した（河川採集アユ）。アユの採集は、種苗放流が行われる前の2007年4月18日に、エレクトリックショッカー（Smith-Root, Inc., USA）を用いて行った。河川採集アユは、塩化ベンザルコニウムで消毒済の容器に収容し、通気しながら富山県水産試験場へ搬送した。その後、平均水温13°Cの地下水をかけ流した2 Lの水槽に収容し、高密度（120 g 体重/L）、無給餌で飼育した。飼育に用いた地下水に *F. psychrophilum* が混入していないことを確認するため、あらかじめ *F. psychrophilum* フリーであることを確認したアユ60尾（平均体重±標準偏差：5.4±0.6 g）を3 Lの水槽に収容し、同様の条件で飼育して対照区とした。

河川採集アユは、高密度飼育下で23日以内に全てが衰弱または死亡した。これらのアユが衰弱または死亡した時点で取上げ、腎臓の組織片を採取して改変サイトファーガ寒天平板培地⁵⁾ に塗抹し、17°C で48～72時間培養した。培地上で黄色集落が発育した場合には、河川採集アユ1尾当たり最大8集落を釣菌した。分離菌について、*F. Psychrophilum* のジャイレース B 遺伝子⁶⁾、ジャイレース A 遺伝子⁷⁾ および Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C (PPIC) 遺伝子⁸⁾ を標的としたPCRを行い、全てのPCRで陽性の場合に分離菌を *F. psychrophilum* であると判定した。さらに、分離菌が *F. Psychrophilum* と判定された場合、ジャイレース B 遺伝子、ジャイレース A 遺伝子および PPIC 遺伝子それぞれのPCR産物について、制限酵素 *RsaI*, *Mph1103I* および *HinfI* を用いたRFLPにより遺伝子型を判定した。

河川採集アユから分離された *F. psychrophilum* 集落の

富山県農林水産総合技術センター水産研究所
* Corresponding author
E-mail: Togo.miyazaki@pref.toyama.lg.jp

うち、ジャイレース B 遺伝子と *RsaI* を組み合わせた PCR-RFLP 検査で遺伝子型が R 型および S 型と判定された 1 株ずつを用い、病原性試験を行った。それぞれの菌株 1 白金耳を 50 mL の改変サイトファーガ液体培地に別々に接種し、17°C で 1 昼夜振盪培養した。培養液の菌濃度は、R 型株は 5.4×10^6 CFU/mL、S 型株は 2.9×10^7 CFU/mL であった。R 型および S 型の培養液それぞれを飼育水 4.5 L で希釈し、*F. psychrophilum* フリーのアユ20尾（平均体重 $\pm$ 標準偏差：10.3 $\pm$ 2.2 g）ずつを収容し、通気しながら 7 時間放置した（以下 R 区および S 区）。対照区では、菌を接種していない改変サイトファーガ液体培地 50 mL を 4.5 L の飼育水に加え、アユ20尾を収容して 7 時間通気した。その後、各区の水槽に水温約 13°C の地下水をかけ流し、12日間無給餌で飼育した。飼育期間中に死亡したアユについては、前述した方法で細菌培養を行った。培地上に黄色集落が発育した場合には、数集落を集菌し、ジャイレース B 遺伝子および *RsaI* を組み合わせた PCR-RFLP 検査を行って遺伝子型を調べた。

飼育期間中の R 区および S 区の死亡率を対照区と比較し、Fisher 法によって有意差を検定した。

結 果

河川採集アユ23尾のうち16尾から黄色集落が分離され、このうち 9 尾から分離された集落が *F. psychrophilum* と判定された。同じ地下水を用いて飼育した対照区では、4 尾のアユから黄色集落が分離されたが、いずれも *F. psychrophilum* ではないと判定された。*F. Psychrophilum* が分離された河川採集アユ 9 尾のうち 5 尾からの分離菌は全て A/R/QR の遺伝子型であったが、残り 4 尾からは A/R/QR および A/S/QR の遺伝子型の菌が分離された。

病原性試験においては、対照区では死亡魚はみられなかったが、R 区および S 区では試験開始 3 日後から死亡が始まり、試験期間中に R 区で20尾中15尾、S 区で20尾中17尾の供試魚が死亡した。各区の死亡魚の腎臓を用い

た再分離では、R 区の死亡魚15尾のうちの11尾（供試尾数に対する割合：55%）および S 区の死亡魚17尾のうちの15尾（供試尾数に対する割合：75%）で黄色集落の発育がみられ、これらの菌のジャイレース B 遺伝子による PCR 検査結果は全て陽性であった（Table 1）。R 区および S 区の死亡率は対照区のそれより有意（ $p < 0.001$ ）に高かった。また、R 区の供試魚からの集落の遺伝子型は全て R 型であり、S 区のそれは全て S 型であった。

考 察

高密度飼育中に衰弱または死亡した河川採集アユの腎臓から *F. psychrophilum* が分離された一方、同じ地下水を用いて同様に飼育した対照区のアユからは *F. psychrophilum* が検出されなかったことから、分離された *F. psychrophilum* は飼育水を介して侵入したものではなく、採集の時点でアユが保有していたものに由来すると考えられる。河川採集アユ 9 尾から *F. psychrophilum* が分離されたが、これらのアユは高密度飼育下で発症したことから、採集時点で 9 尾全てが保菌していたとは言えないが、少なくとも一部のアユが保菌していたことは間違いない。熊谷・縄田^{*1}は、*F. Psychrophilum* が検出限界以下のレベルで感染しているアユを高密度飼育することにより、体内の菌濃度が検出限界以上に増加することを報告している。本試験では、河川採集アユの飼育密度を体重 120 g/L 飼育水容積とし、通常のアユ飼育に比べて10倍以上の高密度としたところ、それらから *F. psychrophilum* が分離されたことから、過密飼育によって *F. Psychrophilum* が体内で増殖し、本試験で用いた方法で検出できる菌数まで増加したと思われる。

田子⁹⁾は、富山県内における 4 月から 6 月の遡上アユの生態を 4 ヶ年にわたって調査し、遡上が始まるのは 4 月上旬であること、遡上魚の体重のモードは 4.0 から 6.6 g にあることおよび体重の最大値は 7.2 g であったことを報告している。本調査で採集を行った時点は、すでに海産アユが遡上を開始している時期であり、海産アユが採

Table 1. Result of a challenge test using *Flavobacterium psychrophilum* isolated from overwintering ayu.

Genotype of <i>F. psychrophilum</i>	Number of ayu challenged	Number of ayu died	Number of ayu died of bacterial cold water disease*	Significance of mortality caused by bacterial cold water disease compared with control (p)
A/R/QR	20	15	11	<0.001
A/S/QR	20	17	15	<0.001
Control	20	0	0	—

* *F. psychrophilum* was re-isolated from dead fish.

*¹ 熊谷 明・縄田 暁 (2006)：宮城水試研究成果要旨集，30-31.

*² 村木誠一・田子泰彦 (2004)：富山水試研報，15，11-18.

集地点付近まで到達していた可能性があった。しかし、河川採集アユの体重は 6.7 g から 16.1 g の範囲で、田子⁹⁾の報告より大型であり、23尾のうち21尾が 7.2 g 以上であったことから、河川採集アユのほとんどまたは全てが越冬アユであったと考えられた。また、村木・田子^{*2)}は、2001年から2002年に富山県内で採集したアユ降下仔魚715尾の PCR 検査を行い、*F. psychrophilum* の遺伝子は全く検出されなかったと報告していること、河口付近で採集した遡上期のアユ120尾の体表または腎臓からは *F. psychrophilum* が分離されなかったこと（未発表）、*F. psychrophilum* は 2 % 以上の塩化ナトリウム存在下では増殖しない¹⁰⁾ ことおよび河口で採集した稚アユ60尾を高密度飼育したところ、衰弱魚または死亡魚の腎臓から *F. psychrophilum* は検出されなかったこと（未発表）から、海産稚アユが *F. psychrophilum* を保有している可能性は低く、本試験で分離された *F. psychrophilum* は、越冬アユが前年から保有していたものである可能性が高いと考えられる。

本試験では、越冬アユから A/R/QR および A/S/QR の遺伝子型の *F. psychrophilum* が検出された。また、A 遺伝子型の菌はアユに対する病原性が高いことが知られており、予想どおりにそれぞれの遺伝子型の代表株はアユに病原性を示した。A 遺伝子型の *F. Psychrophilum* が河川に常在するアユ以外の魚種から検出されることは稀^{6,11)}

であることおよび今回の結果から、越冬アユが河川における A 型 *F. psychrophilum* のキャリアとして次世代への感染源となると考えられる。

謝 辞

本研究は、独立行政法人水産総合研究センターからの健全な内水面生態系復元等推進委託事業の研究費によって実施されました。記して御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kumagai, A., C. Nakayasu and N. Oseko (2004): *Fish Pathol.*, **39**, 183–187.
- 2) 網田健次郎・星野正邦・本間智晴・若林久嗣 (2000): 魚病研究, **35**, 193–197.
- 3) Izumi, S., H. Fujii and F. Aranishi (2005): *J. Fish Dis.*, **28**, 559–564.
- 4) 荒賀忠一 (1984): 「日本産魚類大図鑑, 益田 一・尼岡邦夫・荒賀忠一・上野輝彌・吉野哲夫編」, 東海大学出版会, 東京, pp. 33.
- 5) Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974): *Fish. Sci.*, **40**, 751–757.
- 6) Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003): *Dis. Aquat. Org.*, **56**, 207–214.
- 7) Izumi, S., S. Ouchi, T. Kuge, H. Arai, T. Mito, H. Fujii, F. Aranishi, and A. Shimizu (2007): *J. Fish Dis.*, **30**, 141–147.
- 8) 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006): 魚病研究, **41**, 67–71.
- 9) 田子泰彦 (2002): 日水誌, **68**, 554–563.
- 10) 若林久嗣 (2004): 「魚介類の感染症・寄生虫病, 江草周三監, 若林久嗣・室賀清邦編」, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 177–183.
- 11) 新井 肇・藤田雅弘・鈴木究真・片桐孝之・久下敏広 (2006): 水産増殖, **54**, 575–576.