論文

高知県鏡川におけるアユ細菌性冷水病の疫学調査

今城雅之^{1*}・山崎憲一¹・山下はづき¹・門野真弥¹・片岡榮彦²・大崎靖夫²・高橋 徹²

(2017年5月20日受付)

A Survey of *Flavobacterium psychrophilum* Infection in Ayu *Plecoglossus altivelis* in the Kagami RiverMasayuki Imajoh^{1*}, Kenichi Yamasaki¹, Hazuki Yamashita¹, Shinya Monno¹,
Shigehiko Kataoka², Yasuo Osaki² and Toru Takahashi²¹Laboratory of Fish Disease, Faculty of Agriculture, Kochi University, Kochi 783-8502, Japan²Kagamigawa Fisheries Cooperative Associations, Kochi 780-0933, Japan

(Received May 20, 2017)

ABSTRACT—We examined the amphidromous, land-locked, and released (farmed) ayu in the Kagami River for *Flavobacterium psychrophilum* infections using TaqMan real-time PCR targeting the *PPIC* gene. We collected 524 ayu in 2014–2015 at 4 stations in the lower reaches and 5 stations in the upper reaches of Kagami Dam. The prevalence of infection in apparently healthy individuals did not differ between amphidromous and released fish in the lower reaches or between land-locked and released fish in the upper reaches. However, most dead fish were released ayu. The most commonly isolated *F. psychrophilum* genotype from ayu was A/G-C type. Ayu carrying *F. psychrophilum* were found in mid-June 2014, before ayu fishing season started, at two stations in the upper reaches of the dam. *F. psychrophilum* with genotype A/G-T was detected in 2014–2015 at one of these two stations, suggesting that *F. psychrophilum* reservoirs may be present and part of the overwintering population that contributes to an increase in infection rates in the next year. It is possible that land-locked ayu larvae and juveniles are *F. psychrophilum* reservoirs, because the *PPIC* gene (over 10⁵ copies/L) were detected in the river water collected at the station where eggs were laid in the 2015 spawning season.

Key words: *Flavobacterium psychrophilum*, *Plecoglossus altivelis*, land-locked ayu, genotyping, survey, prevalence, Kagami river

アユ *Plecoglossus altivelis* 細菌性冷水病はグラム陰性の好気性長桿菌 *Flavobacterium psychrophilum* を原因とし、1987年に徳島県の養殖場で最初に確認され、琵琶湖産のアユ種苗によって持ち込まれた可能性が指摘されている(井上, 2000)。1993年には広島県の江の川のアユとオイカワ *Opsariichthys platypus* で冷水病による被害が報告され(Iida and Mizokami, 1996)、以降、全国のアユ生息水域の2割以上で発生が確認されることから(アユ冷水病対策協議会, 2008)、冷水病対策は天然水域の

アユ資源を保全する観点から重要な課題となっている。

高知県高知市中央部に位置する鏡川は高知市土佐山にある標高 593 m の細藪山に源を発し、市街地を南東に流れて浦戸湾に流入する全長 31.1 km、流域面積 170 km² の二級中小河川である。鏡川中流の鏡大利には鏡ダムがあり、ダム下流本川、および支川の吉原川と的淵川では、毎年浦戸湾から天然アユが遡上し、漁獲量最盛期の1975年には生息尾数が126万尾であったと推定されている(岡村ら, 1976)。しかし、その後、堰改築に伴う瀬の縮小と淵の拡大等で河床形態が大きく変化し、その影響からアユの生息に適した水域が大きく減少したため(西日本科学技術研究所, 2014)、2006年から2015年までの生息尾数は15.6万尾から38.1万尾で推移しているのが現状で

¹ 高知大学農学部² 鏡川漁業協同組合

* Corresponding author

E-mail: m-imajoh@kochi-u.ac.jp

ある（西日本科学技術研究所，2015）。また，毎年稚アユの放流が行われ，鏡ダムを境に2つの分布様態，すなわち，ダム下流域では天然アユと放流アユ，ダム上流域では放流アユが生息するようになる（岡村ら，1992）。さらに，2007年に鏡ダム湖でふ化したダム湖産アユの遡上が20年ぶりに見つかり，2010年から2014年の平均推定生息尾数は約10万尾と陸封化が継続しており，新たなアユ資源として期待されている（鏡ダム管理事務所，未発表）。

鏡川では主として琵琶湖産アユ種苗を放流していたが（岡村ら，1992），*F. psychrophilum* の保菌率が高く，冷水病の蔓延要因の懸念があることから（井上，2000；谷口，2002），2012年以降，高知県産の海産系種苗が放流されるようになった。しかし，その一方で冷水病によると思われる死亡事例は後を絶たず，中でも2014年には鏡ダム上流本川においてアユ漁解禁日の7月1日直前の6月下旬にアユが大量死し，人工種苗を放流するという防疫対策では不十分と考えられた。そこで，本研究では，今後の鏡川における冷水病対策の立案に資することを目的として，2014年から2015年の2年間にわたりアユの *F. psychrophilum* 感染実態を明らかにし，加えて2015年には河川水中の本菌の分布挙動を把握した。

材料および方法

供試魚

アユの由来判別の鱗数基準を決定するために，2014年と2015年の5月に Fig. 1 で示された St. 1 で遡上アユ稚魚（2014年は32尾，2015年は45尾）を投網により採捕し，両年4月に放流が行われる際にアユ人工種苗（2014年は40尾，2015年は20尾）を入手した。同種苗は奈半利川および松田川で採捕した天然海産遡上魚，ならびにそれらから生産した1代目（F1）種苗を養成した親魚由来で，放流前にアユ疾病に関する防疫指針（農林水産省，

2011）の保菌検査により *F. psychrophilum* 陰性と確認されたものであった。冷水病の調査対象としたアユは投網，毛針釣り，および友釣りにより採捕した。採捕期間は2014年5月から11月，および2015年3月から11月までとし，採捕地点は鏡ダム下流本川の3地点（トリム堰下流に St. 1，廊中堰下流に St. 2，鏡庁舎前に St. 3），鏡ダム下流的淵川支川の1地点（小川口橋下流に St. 4），鏡ダム上流本川の5地点（天神発電所前に St. 5，弘瀬に St. 6，桑尾に St. 7，たきゆり橋下流に St. 8，土佐山庁舎前に St. 9）とした（Fig. 1）。また，2014年に St. 4 で5月と6月に計11尾，St. 7 で6月に10尾，St. 8 で6月に2尾，および St. 9 で6月に1尾，2015年に St. 4 で6月と7月に計3尾，St. 8 で7月に1尾，および St. 5 で10月に1尾の死亡アユをそれぞれ回収した。総採捕数は2014年に259尾，および2015年に265尾であった。

供試水

採水地点は St. 1，St. 2，St. 3，St. 4，St. 5，St. 6，St. 7，および St. 9 の8地点とし，2015年6月から12月の各月に1～2回ずつ，河川水1 L をポリ瓶に採水した。

菌分離

採捕したアユは外部所見から外観上異常のない個体を正常個体，体表潰瘍を呈した個体を発症個体に選別した。各個体の体長と体重を測定し，左右4枚ずつ鰓を切り出して15 mL 遠沈管に入れ，腎臓は体腎部分を摘出して1.5 mL チューブに回収した。正常個体の鰓と腎臓，発症個体と死亡個体の場合は両組織に潰瘍患部も加えてデイスボループで突き，改変サイトファーガ寒天平板培地（Wakabayashi and Egusa, 1974）に画線塗布して15°C で10日間の培養後，黄褐色のコロニー形成の有無を確認した。

Fig. 1. Location of nine sampling stations along Kagami River (length: 31 km; basin area: 170 km²) which is located in the central Kochi Prefecture on Shikoku Island in Japan.

分離菌からの DNA 抽出とプラスミド抽出

上記の黄褐色のコロニーを釣菌し、20 mL の改変サイトファーガ液体培地で18°C、3日間振とう培養した。その後、培養菌液を4 mL ずつ2本の15 mL 遠沈管に分注し、12,000×g、室温、1分間で遠心分離後、培地上清を除去して菌体ペレットを得て、それぞれをDNeasy Blood & Tissue kit（キアゲン）によるDNA抽出とAccu-Prep Plasmid Mini Extraction kit（バイオニア）によるプラスミド抽出に供した。抽出プラスミドはOneSTEP Ladder Supercoiled Plasmid 分子量マーカー（ニッポンジーン）とともに0.7%アガロースゲル電気泳動に供し、その分子サイズを決定した。

組織からの DNA 抽出

回収した鰓に3 mL のPBS（-）を加え、1分間激しく攪拌し、鰓を丁寧に取出して、500×g、4°C、10分間の遠心分離を行った。その後、上清を別のチューブに移し、10,000×g、4°C、10分間の遠心分離後、上清を捨て、ペレットを500 μL のPBS（-）に懸濁し鰓洗浄濃縮液を作成した。発症個体と死亡個体の潰瘍患部は3～5 mm 角に切り出し、回収した腎臓とともに500 μL のSTE バッファー（10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）を加えてホモジネートした。鰓洗浄濃縮液と腎臓・肉片ホモジネート液に最終濃度1 mg/mL のプロテイナーゼ K 溶液（20 mg/mL, タカラバイオ）を加え、50°C で一晩インキュベートした。その後、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、得られたDNAペレットを500 μL のTE バッファー（10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0）に懸濁し、Q5000 微量紫外可視分光光度計（トミー精工）で十分なDNA純度と収量が得られたことを確認して100 ng/μL の濃度に希釈調整した。

環境水からの DNA 抽出

採水した河川水1 L をセルロース混合エステルメンブレンフィルター（アドバンテック、孔径0.2 μm）で濾過し、フィルター付着物からQIAamp DNA Mini kit（キアゲン）によりDNA抽出を行い、DNA純度と収量が十分であることを上記と同様に確認した。

側線上方横列鱗数の計数

側線上方横列鱗数の計数は岐阜県河川環境研究所のマニュアル（岐阜県河川環境研究所、2011）に準じて行った。鰓と腎臓を摘出した後、右側面の尾柄部から頭部にかけて水性白絵具を塗布し、USB マイクロスコープ（ホーリック）で背鰭の5番目の鰭条の基部の鱗からつながりに沿って斜め下に側線上まで鱗の枚数を計数した。

リアルタイム PCR (qPCR) 法

リアルタイム PCR はロタマーズ遺伝子群の1つであるpeptidyl-prolyl cis-trans isomerase C (PPIC) 遺伝子領域を標的とし、大原ら（2009）のSYBR Green プライマーを改変して、GenBank のアセッション番号AB254195 の配列情報を参照にTaqMan 蛍光プローブを新たに設計した。各プライマーとプローブの塩基配列は次のとおりである。PPIC131-QT-f フォワードプライマー：5'-CCTTC-GATGTAGTTTCTGTGC-3'、PPIC131-QT-r リバースプライマー：5'-TTCTAATTCACGAGATTCGTCTG-3'、PPIC131-QT-p プローブ：5'-FAM- AACCTACAGATGCGGAAC-TAATCGCC-BHQ1-3'。PCR 反応液の組成は、2×KAPA PROBE Fast ABI Prism qPCR Kit Master Mix（カバ・バイオシステムズ）5 μL、10 μM 各プライマー溶液0.3 μL（最終濃度300 nM）、および5 μM プローブ溶液0.4 μL（最終濃度200 nM）を含む反応系に、組織試料由来DNA溶液1 μL、または環境水試料由来DNA溶液1 μLを加え、滅菌水で全量を10 μLとした。1サンプルにつき3ウェルにアプライしてStepOne Plus リアルタイム PCR システム（ライフテクノロジーズ）によりPCR反応を行った。反応条件は、95°C で3分の初期熱変性後、95°C で3秒の熱変性と60°C で20秒のアニール／伸長のサイクルを40回繰り返した。解析はStepOne Software v2.3（ライフテクノロジーズ）を用い、河川水1 LあたりのPPIC 遺伝子のコピー数を得られたCt値から下記の検量線で算出した。

コントロールプラスミドの作製と標準曲線の作成

上記のプライマーセットでPCR増幅産物を作製しTarget Clone kit（東洋紡ライフサイエンス）によりpTA2ベクターにクローニングした。Plasmid Maxi kit（キアゲン）により組換えプラスミドを精製し、その濃度と分子量からアボガドロ定数によりコピー数を算出して 8.6×10^7 copies/μLに調整したものをコントロールプラスミド原液とした。PCR反応は上記と同じ条件で行い、鋳型として10倍階段希釈したコントロールプラスミド溶液（ $8.6 \times 10^1 \sim 8.6 \times 10^7$ copies/μL）1 μLを用いた。

PPIC 遺伝子領域の PCR-RFLP 解析

吉浦ら（2006）の方法を改変したPCR-RFLP解析にqPCR陽性検体と分離菌株を供した。PCR反応は、TaKaRa Ex Taq Hot Start version（タカラバイオ）、プライマーセットfpPPIC1FとfpPPIC1R、1 μLのDNA溶液を用いて、滅菌MQ水で全量を50 μLとし、T100TMサーマルサイクラー（バイオ・ラッド）に供した。反応条件は、初期熱変性が95°Cで30秒、熱変性が95°Cで15秒、アニールが60°Cで30秒、伸長反応が72°Cで30秒の45サイクルの繰り返し、最後に72°Cで5分間の伸

長反応を行った。5 μ L の PCR 反応液に 0.5 μ L の *Hinf*I (10 units/ μ L, タカラバイオ) と 1 μ L の 10 $\times$ H buffer を加え、滅菌 MQ 水で全量を 10 μ L とし、37 $^{\circ}$ C で 3 時間の消化反応を行った。消化断片長は 3% アガロースゲル電気泳動で確認した。

DNA gyrase subunit A (*gyrA*) 遺伝子領域の on/off スイッチアッセイ

on/off スイッチアッセイは Fujiwara-Nagata *et al.* (2012) の方法を改変して行い、PCR-RFLP 解析と同様に qPCR 陽性検体と分離菌株を供した。PCR 反応は、TaKaRa PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ) を用い、3' 末端にホスホロチオエート結合を介した塩基を 1 つ導入したフォワードプライマーの *gyrA*-125A と *gyrA*-125G, リバースプライマーの *gyrA*-202T と *gyrA*-202C を 4 通りの組み合わせで行った。反応条件は、初期熱変性が 95 $^{\circ}$ C で 30 秒、熱変性が 98 $^{\circ}$ C で 10 秒、アニーリングが 61.5 $^{\circ}$ C で 5 秒、伸長反応が 72 $^{\circ}$ C で 30 秒の 45 サイクルの繰り返し、最後に 72 $^{\circ}$ C で 5 分間の伸長反応を行った。得られた PCR 産物は 3% アガロースゲル電気泳動で確認した。

結 果

アユの由来判別

St. 1 で採捕した遡上アユ稚魚の側線上方横列鱗数を計数した結果、2014 年の 32 尾中 29 尾、および 2015 年の 45 尾中 38 尾で 17 枚以上となり、残りの個体はサイズが小さく計数不能であった (data not shown)。また、鏡川で放流されたアユ人工種苗では 2014 年の 40 尾中 39 尾で 16 枚以下と残り 1 尾で 17 枚、2015 年の 20 尾中 18 尾で 15 枚以下と残り 2 尾で 16 枚となった。よって、鏡ダム下流のアユについて、2014 年に採捕した 137 尾のうち 16 枚以下を放流アユ、17 枚を不明、および 18 枚以上を天然アユ、2015 年に採捕した 179 尾のうち 15 枚以下を放流アユ、16 枚を不明、および 17 枚以上を天然アユと判別し、キズやサイズ等で計数不能の個体も不明に含めた。西日本科学技術研究所の調査結果 (高知県高知土木事務所鏡ダム管理事務所, 2017) からアユの背鰭第 1 軟条を計数基点とする側線上方横列鱗数に関しても、放流されたアユ人工種苗の鱗数の頻度分布は上記の結果と同様に年によって差があることが示され、鏡ダム上流のアユについてその鱗数以上のものをダム湖産アユとしていたことから、同基準に基づき鏡ダム上流で 2014 年に採捕した 122 尾と 2015 年に採捕した 86 尾について、放流アユと不明の判別は上記の鱗数に従い、それ以上の鱗数を持つアユをダム湖産とした。

正常個体での天然アユと放流アユの割合は 2014 年において 5 月に St. 1 で 76.9% と 7.7%, St. 2 で 85.7% と 9.5%,

St. 3 で 11.8% と 64.7%, および St. 4 で 0% と 100%, 2015 年において 3 月に St. 1 で 41.3% と 0%, 4 月に St. 1 で 26.7% と 0%, 5 月に St. 1 で 50% と 0%, St. 2 で 92.3% と 7.7%, および St. 3 で 70.8% と 25% を占め、両年とも 5 月に河口側ほど放流アユの割合が低くなる傾向にあった (Table 1)。St. 2 の正常個体では 2014 年において 9 月に 75% が放流アユ、10 月に 60% が天然アユ、2015 年において 9 月と 10 月に 77.3% と 73.3% が天然アユ、11 月に 63.2% が放流アユと最も多く、月の経過に従って 2014 年は放流アユから天然アユ、2015 年は天然アユから放流アユへと優占が遷移した。また、同地点での 2015 年 11 月の発症個体は天然アユのみとなった。鏡川下流のうち St. 4 のみで回収できた死亡個体では 2014 年 5 月に 66.7% が放流アユと 33.3% が不明アユ、2014 年 6 月と 2015 年 6 月に放流アユのみ、および 2015 年 7 月に天然アユのみとなった。鏡ダム上流の正常個体ではダム湖産アユの割合は 2014 年の 6 ~ 7 月間で 0 ~ 20%, 2015 年の同月間で 33.3 ~ 100% を推移し、全体的に 2015 年の方が高かったものの、St. 6 では 9 月に 6.7% まで減少した。また、同地点では発症個体が採捕され、2014 年 6 月と 2015 年 6 月ともに全て放流アユとなった。鏡ダム上流 4 地点の死亡個体では 2015 年 10 月の St. 5 を除き、90 ~ 100% とほとんどが放流アユで占められた。

コントロールプラスミドの PCR 増幅効率と定量性の検討

8.6×10^1 copies から 8.6×10^7 copies の範囲で、相関係数が 0.999, 増幅効率が 97.3%, 傾きが -3.584, および Y 切片が 42.552 となる検量線が得られ、コントロールプラスミドのコピー数と Ct 値との相関性が確認された (data not shown)。

qPCR によるアユの *F. psychrophilum* 陽性率

St. 1 の正常個体での陽性率は 2014 年において 5 月に天然アユの鰓と腎臓で 23.1%, 2015 年において 4 月に不明アユの腎臓で 3.3%, 5 月に天然アユと不明アユの鰓で 16.7% となり、遡上時期に St. 1 で天然アユが保菌していることが確認された (Table 2)。また、2014 年 5 月には St. 1 に加え、St. 3 の放流アユと不明アユの腎臓で 17.6% と 5.9%, St. 4 の放流アユの鰓で 21.7% と腎臓で 8.7% が陽性となり、鏡ダム下流の広範囲で保菌アユが存在していた。St. 2 の正常個体での陽性率は 2014 年 10 月に天然アユの鰓で 5%, 2015 年 11 月に放流アユの鰓で 26.3% となった。St. 6 の正常個体での陽性率は 2014 年において 6 月にダム湖産アユと放流アユの腎臓で 4% と 20%, 2015 年において 7 月にダム湖産アユの鰓と腎臓で 40% と 20%, 放流アユと不明アユの鰓で 20%, 9 月に放流アユの鰓で 13.3% となり、発症個体では 2015 年 6 月に全ての放流アユの体表患部で陽性となった。また、2014 年 6 月

Table 1. Details of ayu caught at nine sampling stations in the Kagami River

Month	Location	Total no. of individuals	Mean $\pm$ SD of total length (cm)	Mean $\pm$ SD of body weight (g)	% of amphidromous individuals	% of land-locked individuals	% of released individuals	% of unknown-origin individuals
Apparently healthy individuals								
2014								
May	St. 1	13	7.6 $\pm$ 1.7	3.9 $\pm$ 4.1	76.9	—	7.7	15.4
	St. 2	21	13.5 $\pm$ 2.9	26.2 $\pm$ 17.3	85.7	—	9.5	4.8
	St. 3	17	16.9 $\pm$ 1.0	42.8 $\pm$ 10.5	11.8	—	64.7	23.5
	St. 4	23	12.9 $\pm$ 1.6	16.3 $\pm$ 6.0	0	—	100	0
Jun.	St. 6	25	18.6 $\pm$ 1.5	67.9 $\pm$ 16.9	—	20	80	0
	St. 7	28	19.4 $\pm$ 1.8	76.3 $\pm$ 22.3	—	3.6	96.4	0
	St. 9	19	18.5 $\pm$ 1.8	59.6 $\pm$ 19.8	—	5.3	94.7	0
Jul.	St. 6	13	19.4 $\pm$ 2.4	64.8 $\pm$ 24.4	—	0	92.3	7.7
	St. 7	13	19.2 $\pm$ 2.3	65.3 $\pm$ 19.0	—	7.7	92.3	0
	St. 9	10	18.3 $\pm$ 2.6	53.3 $\pm$ 19.9	—	10	90	0
Sep.	St. 2	32	14.4 $\pm$ 1.9	24.0 $\pm$ 15.8	18.8	—	75	6.2
Oct.	St. 2	20	16.6 $\pm$ 1.4	36.3 $\pm$ 10.6	60	—	25	15
2015								
Mar.	St. 1	46	6.4 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.7	41.3	—	0	58.7
Apr.	St. 1	30	5.6 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.2	26.7	—	0	73.3
May	St. 1	6	5.8 $\pm$ 0.8	1.1 $\pm$ 0.6	50	—	0	50
	St. 2	13	15.6 $\pm$ 1.1	34.6 $\pm$ 7.4	92.3	—	7.7	0
	St. 3	24	17.3 $\pm$ 1.3	51.2 $\pm$ 14.3	70.8	—	25	4.2
Jun.	St. 6	6	19.6 $\pm$ 1.9	85.0 $\pm$ 27.8	—	100	0	0
	St. 7	8	19.4 $\pm$ 2.0	82.2 $\pm$ 35.2	—	37.5	37.5	25
	St. 9	10	18.3 $\pm$ 2.1	59.4 $\pm$ 25.3	—	40	40	20
Jul.	St. 6	5	18.7 $\pm$ 1.3	56.3 $\pm$ 13.2	—	40	40	20
	St. 8	8	16.8 $\pm$ 0.8	35.5 $\pm$ 5.1	—	62.5	25	12.5
	St. 9	6	16.0 $\pm$ 5.2	36.8 $\pm$ 14.7	—	33.3	50	16.7
Sep.	St. 2	22	18.8 $\pm$ 2.1	57.6 $\pm$ 19.0	77.3	—	0	22.7
	St. 6	15	19.6 $\pm$ 1.5	69.2 $\pm$ 19.9	—	6.7	66.7	26.6
Oct.	St. 2	15	14.4 $\pm$ 2.8	24.5 $\pm$ 14.4	73.3	—	6.7	20
	St. 5	24	20.6 $\pm$ 1.7	78.8 $\pm$ 25.8	—	20.8	58.3	20.9
Nov.	St. 2	19	18.2 $\pm$ 2.7	38.2 $\pm$ 23.1	26.3	—	63.2	10.5
Sickly individuals with skin lesions								
2014								
Jun.	St. 6	1	20.7	92.1	—	0	100	0
2015								
Jun.	St. 6	2	17.1 $\pm$ 1.5	49.1 $\pm$ 17.7	—	0	100	0
Nov.	St. 2	1	25.5	122.7	100	—	0	0
Dead individuals								
2014								
May	St. 4	3	14.3 $\pm$ 0.9	21.4 $\pm$ 5.9	0	—	66.7	33.3
Jun.	St. 4	8	16.2 $\pm$ 2.0	37.3 $\pm$ 14.8	0	—	100	0
	St. 7	10	17.7 $\pm$ 2.5	49.4 $\pm$ 24.1	—	0	90	10
	St. 8	2	18.5 $\pm$ 0.6	49.4 $\pm$ 8.6	—	0	100	0
	St. 9	1	19.5	60.0	—	0	100	0
2015								
Jun.	St. 4	1	18.5	56.4	0	—	100	0
Jul.	St. 4	2	17 $\pm$ 2.1	43.1 $\pm$ 18.8	100	—	0	0
	St. 8	1	17.3	34.6	—	0	100	0
Oct.	St. 5	1	19.8	67.6	—	0	0	100

には加えて St. 7 のダム湖産アユの鰓でも3.6%が陽性で、その後の6月下旬に大量死が発生する前に少なくとも鏡ダム上流の2地点で保菌アユが存在していたことが示された。St. 4 の死亡個体での陽性率は2014年において5月に放流アユと不明アユの鰓で66.7%と33.3%，放流アユの腎臓で33.3%，6月に放流アユの鰓で37.5%，腎臓で75%，および体表患部で50%，2015年において6月に放

流アユの鰓、腎臓、および体表患部で100%，7月に天然アユの鰓で50%と体表患部で100%となった。鏡ダム上流4地点の死亡個体は2014年6月の St. 7，および2015年10月の St. 5 を除き全て放流アユであり，そのうち最も検出頻度の高かったのは鰓で80～100%の陽性率となった。

Table 2. Prevalence of *F. psychrophilum* in apparently healthy, sickly, and dead ayu, as assessed by TaqMan qPCR

Month	Location	Biopsy tissue	% (no.) of individuals positive for <i>F. psychrophilum</i> by qPCR			
			Amphidromous individuals	Land-locked individuals	Released individuals	Unknown-origin individuals
Apparently healthy individuals						
2014						
May	St. 1	Gills	23.1 (3)	—	0 (0)	0 (0)
		Kidney	23.1 (3)	—	0 (0)	0 (0)
	St. 3	Kidney	0 (0)	—	17.6 (3)	5.9 (1)
		St. 4	Gills	0 (0)	—	21.7 (5)
	Kidney		0 (0)	—	8.7 (2)	0 (0)
Jun.	St. 6	Kidney	—	4 (1)	20 (5)	0 (0)
	St. 7	Gills	—	3.6 (1)	0 (0)	0 (0)
Oct.	St. 2	Gills	5 (1)	—	0 (0)	0 (0)
2015						
Apr.	St. 1	Kidney	0 (0)	—	0 (0)	3.3 (1)
May	St. 1	Gills	16.7 (1)	—	0 (0)	16.7 (1)
Jul.	St. 6	Gills	—	40 (2)	20 (1)	20 (1)
		Kidney	—	20 (1)	0 (0)	0 (0)
		Kidney	—	16.7 (1)	0 (0)	0 (0)
Sep.	St. 6	Gills	—	0 (0)	13.3 (2)	0 (0)
Oct.	St. 5	Gills	—	4.2 (1)	0 (0)	0 (0)
Nov.	St. 2	Gills	0 (0)	—	26.3 (5)	0 (0)
Sickly individuals with skin lesions						
2014						
Jun.	St. 6	Affected skin area	—	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2015						
Jun.	St. 6	Affected skin area	—	0 (0)	100 (2)	0 (0)
Nov.	St. 2	Affected skin area	0 (0)	—	0 (0)	0 (0)
Dead individuals						
2014						
May	St. 4	Gills	0 (0)	—	66.7 (2)	33.3 (1)
		Kidney	0 (0)	—	33.3 (1)	0 (0)
Jun.	St. 4	Gills	0 (0)	—	37.5 (3)	0 (0)
		Kidney	0 (0)	—	75 (6)	0 (0)
		Affected skin area	0 (0)	—	50 (4)	0 (0)
		St. 7	Gills	—	0 (0)	80 (8)
	Kidney		—	0 (0)	10 (1)	0 (0)
	Affected skin area		—	0 (0)	10 (1)	0 (0)
	St. 8	Gills	—	0 (0)	100 (2)	0 (0)
		Affected skin area	—	0 (0)	100 (2)	0 (0)
	St. 9	Gills	—	0 (0)	100 (1)	0 (0)
		Kidney	—	0 (0)	100 (1)	0 (0)
Affected skin area	—	0 (0)	100 (1)	0 (0)		
2015						
Jun.	St. 4	Gills	0 (0)	—	100 (1)	0 (0)
		Kidney	0 (0)	—	100 (1)	0 (0)
		Affected skin area	0 (0)	—	100 (1)	0 (0)
Jul.	St. 4	Gills	50 (1)	—	0 (0)	0 (0)
		Affected skin area	100 (2)	—	0 (0)	0 (0)
	St. 8	Gills	—	0 (0)	100 (1)	0 (0)
		Affected skin area	—	0 (0)	100 (1)	0 (0)
Oct.	St. 5	Gills	—	0 (0)	0 (0)	100 (1)

qPCR による環境水中の *F. psychrophilum* 検出と定量

鏡ダム下流 3 地点では *PPIC* 遺伝子は散発的に検出され、平均コピー数は St. 1 で 6 月 29 日に 6.6×10^4 copies/L, 9 月 9 日に 4.9×10^3 copies/L, および 12 月 1 日に 3×10^4 copies/L, St. 2 で 6 月 29 日に 1.1×10^5 copies/L, および 9 月 9 日に 3.7×10^4 copies/L, St. 3 で 6 月 29 日のみに 3.3×10^4 copies/L となった (Fig. 2)。一方で, St. 4 では 6 月 29 日に 2.4×10^5 copies/L, 8 月 11 日に 2.2×10^4

copies/L の濃度で *PPIC* 遺伝子が検出され, 10 月 14 日以降検出が継続して, 平均コピー数は $1.7 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^5$ copies/L の範囲で分布した。St. 5 では 9 月 9 日から *PPIC* 遺伝子が検出され, 10 月 28 日に 2.6×10^5 copies/L, 11 月 13 日に 2.0×10^5 copies/L, および 12 月 1 日に 4.7×10^5 copies/L とそれぞれで最も高いコピー数が得られた。*PPIC* 遺伝子の検出頻度が最も高かったのは St. 6 であり, 7 月 25 日を除き全て検出され, 平均コピー数は 6 月 29 日

Fig. 2. Seasonal changes in the number of copies of the *PPIC* gene of *F. psychrophilum* in river water (points, right axis) and the water temperature (lines, left axis). Solid lines: St. 1 (blue), St. 2 (pink), St. 3 (green), and St. 4 (yellow) (lower reaches of Kagami Dam). Dashed lines: St. 5 (pink), St. 6 (blue), St. 7 (green), and St. 9 (yellow) (upper reaches). Red points: St. 1 (circles), St. 2 (squares), St. 3 (triangles). Pink points: St. 4 (circles). Blue points: St. 5 (squares), St. 6 (triangles), St. 7 (circles), St. 9 (diamonds). Error bars represent standard deviation ($n = 3$).

Table 3. Genotyping of *F. psychrophilum* detected by isolation and cultivation on modified cytophaga agar plates

Month	Location	Biopsy tissue	Total no. of isolates	Genotyping								
				PPIC gene		gyrA gene				Plasmid		
				A	B	G-C	G-T	A-C	A-T	4.1 kbp	2.4 kbp	None
Apparently healthy individuals												
2014												
Jun.	St. 6	Kidney	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	St. 7	Gills	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
2015												
Jul.	St. 6	Gills	3	3	0	3	0	0	0	3	0	0
	St. 9	Kidney	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Oct.	St. 5	Gills	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Nov.	St. 2	Gills	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Sickly individuals with skin lesions												
2014												
Jun.	St. 6	Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
2015												
Jun.	St. 6	Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Nov.	St. 2	Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Dead individuals												
2014												
May	St. 4	Gills	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
		Kidney	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
Jun.	St. 4	Gills	3	3	0	3	0	0	0	3	0	0
		Kidney	2	2	0	2	0	0	0	2	0	0
		Affected skin area	4	3	1	3	0	1	0	2	1	1
	St. 7	Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
	St. 8	Affected skin area	2	2	0	2	0	0	0	2	0	0
	St. 9	Gills	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
		Kidney	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
		Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0
2015												
Jun.	St. 4	Affected skin area	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
Total			29	28	1	28	0	1	0	21	1	6

に 2.3×10^5 copies/L と最も高く、9月29日に 1.5×10^3 copies/L と最も低くなった。一方で、St. 6 と比較して St. 7 と St. 9 での検出頻度は少なく、期間を通して St. 7 では6月29日に 1.2×10^5 copies/L と12月1日に 1.3×10^5 copies/L、St. 9 では12月1日に 1.1×10^5 copies/L と高い値が目立った。

F. psychrophilum の遺伝子型判別

吉浦ら (2006) に従い A 型と B 型を判別する PCR-RFLP 解析と Fujiwara-Nagata *et al.* (2012) に従い G-C 型、G-T 型、A-C 型、および A-T 型を判別する on/off スイッチアッセイの結果を組み合わせで遺伝子型を決定した。Table 2 に示した qPCR 陽性88検体のうち85検体から A/G-C 型が検出され、そのほとんどを占めていた (data not shown)。St. 6 で2014年6月の正常個体由来の腎臓1検体と2015年6月の発症個体由来の患部1検体から A/G-T 型、St. 4 で2014年6月の死亡個体由来の患部1検体から B/A-C 型が検出され、両地点に特有の遺伝子型がそれぞれ確認された。

Table 3 に示したように正常個体から8株、発症個体から3株、および死亡個体から18株の計29株の分離菌株が得られ、上記の遺伝子型に加えてプラスミド保有の有無とそのサイズを決定した。29株のうち21株は A/G-C/4.1 kbp 型、7株は A/G-C/None 型、1株は B/A-C/2.4 kbp 型となり、A/G-C/4.1 kbp 型が全体の7割以上を占めていた。

考 察

鏡川では2014年8月豪雨の影響で記録的な土砂災害が発生し、以降、特に鏡ダム上流本川では年間を通じたアユのサンプリングの継続が困難になった。そのため、翌年も継続して2年間にわたりアユの *F. psychrophilum* 感染実態を調査した。

2014年6月下旬に鏡ダム上流本川の広域でアユの大量死が起り深刻な被害となった。その際に St. 7、St. 8、および St. 9 で回収した死亡アユの鰓、腎臓、体表患部のいずれかで qPCR により全て *F. psychrophilum* が検出され、さらに大量死前の6月16日に St. 6 と St. 7 で採捕したアユから保菌アユが見つかったが、その割合は低く、2週間程度で状況が一変したことになる。6月22日の降雨後、鏡ダム上流の広域で異様な強い濁水が観察されており、大量死の引き金として水環境変化が挙げられた。濁水はアユにとってストレスとして作用し、濁度と暴露時間に依存して血中コルチゾール濃度が上昇することが報告されている (安房田ら, 2010)。水環境変化と冷水病発生との明確な相関関係は未だ明確にされていないが (Strepparava *et al.*, 2014)、大量死時、冷水病に加えてチョウチン病を発症したアユも確認されており、少

なくともアユが集団でストレスを受けていたと判断できる。ストレス反応が進行すると、アユの免疫機能は低下して冷水病などの疾病に罹りやすい状態に陥ることから (Iguchi *et al.*, 2002, 2003)、当時、濁水に暴露された鏡ダム上流のアユは冷水病に対する感受性が高まっており、既存の保菌アユが感染源となり、わずかの期間で冷水病の集団発生に至ったと推察された。

F. psychrophilum の遺伝子型は宿主域や病原性と密接に関連するとされ、PPIC 遺伝子の PCR-RFLP 法で判別される A 型はアユで認められるのに対し、B 型はアユよりもサケ科魚類、コイ科魚類、およびウナギといった他魚種で認められることが多く、またアユに対する病原性は低い (Izumi *et al.*, 2003; 田畑, 2004; 吉浦ら, 2006)。正常アユから最も優占して検出された *F. psychrophilum* は A/G-C 型であり、qPCR と菌分離を含め、2014年は96.3%、2015年は100%の割合をそれぞれ占め、高頻度で保菌されているタイプであることが示された。また、*gyrA* 遺伝子領域の on/off スイッチアッセイで分類される G-C 型はアユに高い病原性を示し、他の3つの型は病原性が低い、もしくはないとされている (Fujiwara-Nagata *et al.*, 2012)。2014年6月のダム上流の死亡アユから検出された *F. psychrophilum* は全て A/G-C 型で、大量死時の冷水病の原因であったことが明らかとなった。

Izumi and Aranishi (2004) はプラスミドプロファイルにより *F. psychrophilum* を 2.8 kbp, 3.4 kbp, 4.1 kbp, または 5.2 kbp プラスミドのいずれかを保有するタイプとプラスミドを保有しないタイプの5つに分け、4.1 kbp プラスミド保有は日本分離株に特有で、多くはアユ由来であると報告した。Kim *et al.* (2010) もプラスミドプロファイルにより日本分離株をグループ分けし、アユ由来株は主に 3.5 kbp, または 2.4 kbp プラスミド保有、プラスミド未保有の3つのタイプのいずれかとなり、前者らが示したプラスミドの分子量と差があった。Izumi and Aranishi (2004) は手法の違いにより推定される分子量に差が生じる可能性を指摘しており、Chakroun *et al.* (1998) によって報告された徳島県アユ由来で 3.0 kbp と 3.7 kbp プラスミド保有の FPC837 株、および 3.7 kbp プラスミド保有の FPC840 株はともに 4.1 kbp プラスミドを保有するとした。そのため、おそらく Kim *et al.* (2010) の 3.5 kbp プラスミドは Izumi and Aranishi (2004) の 4.1 kbp プラスミドと同じであり、鏡川のアユにはアユ特有の典型的なタイプが優占して感染していると思われた。

人工種苗は親魚の違いにより冷水病の感受性に差があり、海産系種苗は長期継代種苗や湖産系種苗よりも冷水病に強いとされている (Nagai *et al.*, 2004; 増成ら, 2004; 水戸ら, 2007; 桑田ら, 2010; 三浦ら, 2012; Kageyama *et al.*, 2013)。鏡川では海産系種苗を放流しており、放流地点となる St. 3 と St. 4 では5月の放流直後

に放流アユが保菌した状態になり、最も河口側の St. 1 では3～5月の遡上期に天然遡上アユが保菌しているのが確認されたが、アユの由来別で陽性率の割合に明確な差はなく、鏡ダム上流でのダム湖産アユと放流アユ間の陽性率も同様であった。その一方で、鏡ダム上下流で回収された死亡アユのほとんどは放流アユとなり、優先的に放流アユが死亡している可能性が示唆された。泉川・近藤（2009）も実験感染により、天然遡上アユは耐病性が高いとされている海産系種苗 F1 よりもさらに冷水病に強いことを報告している。

環境水中から *F. psychrophilum* を検出する loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が以前に報告され、DNA を抽出する際に PCR 阻害物質が混入することから、DNA 標準物質を環境試水に加えることでその影響を受けず正確に定量できるとした（永田・江口，2007；Fujiwara-Nagata and Eguchi, 2012）。本研究では Nikaeen and Makimura（2007）により PCR 阻害物質除去の有用性が報告された QIAamp DNA Mini kit を用いて DNA 抽出を行い、qPCR により環境水中から *F. psychrophilum* を検出した結果、鏡ダム上流の St. 6 において検出頻度が最も高くなった。同地点は縄張りアユが毎年多く見られる友釣りの良場として知られ、その縄張りアユはけんかによるストレスで冷水病に罹患しやすいとされており（清流西城川編集会議，2008）、実際に鏡ダム上流の中で唯一発症アユが採捕された場所でもあり、2014年と2015年ともに冷水病発生盛期の6～7月に正常アユで最も高い陽性率が示されたこと等を考慮すると、*F. psychrophilum* の感染拡大が最も起こりやすい環境にあると考えられた。

Kumagai et al.（2010）は、河川産卵場に集積したアユで冷水病の保菌率の上昇が見られ、その要因に水温低下と成熟に伴う生体防御効果の低下を挙げている。鏡川下流の St. 1 と St. 2 は安定的に産卵場が形成される地点であり、2015年は10月下旬に河床成形成が実施され、11月20日のアユ産卵調査によると、最も大きい面積の産卵場が St. 1、それに次ぐのが St. 2 で形成されており、産卵場の総面積は過去10年間で最大規模であったと報告されている（西日本科学技術研究所，2016）。また、2015年の産卵期間中、10月の降水量はかなり少なかったため、河川流量は $4 \text{ m}^3/\text{s}$ 前後の低水準で推移していたが、翌月の13日から14日にかけて総雨量 100 mm 超の降雨により流量は $20 \text{ m}^3/\text{s}$ 以上に急増し、このタイミングで親アユの流下が大きく促進されたと予想されている（西日本科学技術研究所，2016）。よって、11月13日の降雨前には St. 1 と St. 2 で *F. psychrophilum* が検出されず、12月1日に St. 1 で検出されるようになったのは、流下アユの産卵場での集積の有無に関連していたと推定できる。

鏡ダム上流では2006年からアユの陸封化が継続しており、St. 5 でアユの産卵場が形成されることから（鏡ダム

管理事務所，未発表），上記の関連性は同地点にも当てはまると考えられ、アユの産卵による集積の影響から10月28日～12月1日に高いコピー数で *F. psychrophilum* が検出されたと示唆された。*F. psychrophilum* は環境水等の飢餓条件下ではどの温度でも増殖することができず、 22°C から 27°C で2日から7日以内、 28°C で2日以内にコロニー形成能を失うことから（Sugahara et al., 2010），これらの高水温の範囲にあった2015年8月11日と22日の間は感染拡大が起こりにくい状況にあったと想定された。一方、低水温の場合、フィルターとオートクレーブによる滅菌湖試水中でコロニー形成能を有する生菌は 5°C で56日間、 15°C で300日間存在すること（Madetoja et al., 2003），またフィルターによる滅菌河川試水中でも 14°C で19週間後まで生菌が存在することが確認されている（Vatsos et al., 2003）。そのため、産卵時期に St. 5 の環境水から高コピーで検出された *F. psychrophilum* は新たに感染できる可能性が高く、サケマス卵で確認されている卵内感染がアユ卵では起こらないとされる一方で（Kumagai et al., 2004），仔稚魚期のダム湖産アユは河川水中の本菌に感染して保菌状態になる可能性があるとし唆された。

鏡ダム上流では2014年にアユ漁解禁前の6月時点で St. 6 と St. 7 に *F. psychrophilum* 保菌アユが確認されたことと、2年間にわたり St. 6 のアユでのみ A/G-T 型 *F. psychrophilum* が検出されたことから、本菌の周年定着が疑われる。その助長要因として上記のダム湖産アユに加え、A 型 *F. psychrophilum* 保菌がこれまでに報告されている越冬アユ（宮崎，2008），オイカワ，アカザ *Liobagrus reini*，オオクチバス *Micropterus salmoides*，ヌマチチブ *Tridentiger brevispinis*，カダヤシ *Gambusia affinis*，およびカワムツ *Nipponocypris temminckii*（新井ら，2006；Izumi et al., 2007；藤井ら，2009），付着藻類やアオミドロ（谷本・竹内，2005）などが候補に挙げられる。鏡ダム上流のダム湖産アユの生息数は毎年放流される数に相当するほど豊富であるとされ（西日本科学技術研究所，2010），鏡川の重要なアユ資源として期待されていることから、冷水病との関連性を今後より詳細に検討していかなければならない。

謝 辞

本研究は高知大学における平成26年度「研究科長裁量経費」の助成を受けて一部実施されたものである。鏡川のアユに関する情報と資料提供など多大なご協力をいただきました株式会社西日本科学技術研究所の藤田真二様、高知県水産振興部漁業管理課の松浦秀俊様、ならびに高知県内水面漁業センターの長岩理央様と占部敦史様に深く御礼申し上げます。

文 献

- 新井 肇・藤田雅弘・鈴木究真・片桐孝之・久下敏宏 (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**, 575–576.
- 安房田智司・武島弘彦・鶴田哲也・矢田 崇・井口恵一朗 (2010): 短時間・長時間の濁りに対するアユのストレス応答. 水産増殖, **58**, 425–427.
- アユ冷水病対策協議会 (2008): アユ冷水病対策協議会取りまとめ. 農林水産省, 1–23.
- Chakroun, C., F. Grimont, M. C. Urdaci and J. F. Bernardet (1998): Fingerprinting of *Flavobacterium psychrophilum* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *Dis. Aquat. Organ.*, **33**, 167–177.
- 藤井久之・原田慈雄・小峠利勝 (2009): 有田川における在来魚の冷水病菌保菌状況とカワムツから分離された冷水病菌のアユに対する病原性. 水産増殖, **57**, 621–622.
- Fujiwara-Nagata, E. and M. Eguchi (2012): A quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for *Flavobacterium psychrophilum* in river-water samples containing DNA amplification inhibitors. *Aquacult. Sci.*, **60**, 469–474.
- Fujiwara-Nagata, E., J. Ikeda, K. Sugahara and M. Eguchi (2012): A novel genotyping technique for distinguishing between *Flavobacterium psychrophilum* isolates virulent and avirulent to ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **35**, 471–480.
- 岐阜県河川環境研究所 (2011): アユの側線上方横列鱗数の計数マニュアル Ver. 1. 岐阜県河川環境研究所, 各務原, 11 p.
- Iguchi, K., F. Ito, K. Ogawa, N. Matsubara, T. Yodo and T. Yamasaki (2002): Reduction of transport stress of ayu by obligated schooling. *Fisheries Sci.*, **68**, 849–853.
- Iguchi, K., K. Ogawa, M. Nagae and F. Ito (2003): The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, **220**, 515–523.
- Iida, Y. and A. Mizokami (1996): Outbreaks of coldwater disease in wild ayu and pale chub. *Fish Pathol.*, **31**, 157–164.
- 井上 潔 (2000): アユの冷水病. 海洋と生物, **126**, 35–38.
- Izumi, S. and F. Aranishi (2004): Plasmid profiling of Japanese *Flavobacterium psychrophilum* isolates. *J. Aquat. Anim. Health*, **16**, 99–103.
- Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003): Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. Aquat. Organ.*, **56**, 207–214.
- Izumi, S., S. Ouchi, T. Kuge, H. Arai, T. Mito, H. Fujii, F. Aranishi and A. Shimizu (2007): PCR-RFLP genotypes associated with quinine resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *J. Fish Dis.*, **30**, 141–147.
- 泉川晃一・近藤正美 (2009): 人工アユ種苗と吉井川に遡上する天然アユの冷水病感受性の違い. 岡山水試報, **24**, 158–160.
- Kageyama, T., T. Kuwada, K. Ohara, A. Nouno, T. Umino and S. Furusawa (2013): Comparisons of internal behavior after exposure to *Flavobacterium psychrophilum* between two ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) strains showing different cumulative mortality to bacterial cold water disease. *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1571–1575.
- Kim, J. H., D. K. Gomez, T. Nakai and S. C. Park (2010): Plasmid profiling of *Flavobacterium psychrophilum* isolates from ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) and other fish species in Japan. *J. Vet. Sci.*, **11**, 85–87.
- 高知県高知土木事務所鏡ダム管理事務所 (2017): 平成27–28年度鏡ダム貯水池保全生態調査委託業務報告書. 高知県高知土木事務所鏡ダム管理事務所, 高知, pp. 40–41.
- Kumagai, A., C. Nakayasu and N. Oseko (2004): No evidence for the presence of *Flavobacterium psychrophilum* within ayu eggs. *Fish Pathol.*, **39**, 183–187.
- Kumagai, A., A. Nawata and Y. Taniiai (2010): Monitoring of outbreaks of bacterial cold water disease among ayu in a river where asymptomatic carriers of *Flavobacterium psychrophilum* were released. *Fish Pathol.*, **45**, 115–120.
- 桑田知宣・景山哲史・大原健一・原 徹・斉藤 薫 (2010): 冷水病に強く、良く釣れる人工アユ種苗の開発と利用. 岐河環研報, **55**, 5–15.
- Madetoja, J., S. Nystedt and T. Wiklund (2003): Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **43**, 217–223.
- 増成伸文・難波洋平・植木範行 (2004): 継代数の異なる親魚を用いて生産したアユ人工産種苗の冷水病耐性の差. 岡山水試報, **19**, 17–20.
- 水戸 鼓・村田 守・近藤正美 (2007): アユ親魚の由来による冷水病耐性の違いについて. 岡山水試報, **22**, 33–35.
- 三浦正之・坪井潤一・岡崎 巧・大浜秀規・芦澤晃彦 (2012): 人工アユ種苗の遊漁資源としての特性評価: 同一環境で継代飼育された2系統間の比較. 日本水産学会誌, **78**, 1149–1158.
- 宮崎統五 (2008): 越冬アユから分離された細菌性冷水病原因菌 *Flavobacterium psychrophilum*. 魚病研究, **43**, 167–169.
- 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.
- 永田恵里奈・江口 充 (2007): 環境水におけるアユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング. 日本水産学会誌, **73**, 306–309.
- Nikaeen, M. and K. Makimura (2007): Evaluation of QIAamp DNA mini kit for removing of inhibitors in detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples by a nested-PCR assay. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **4**, 241–246.
- 西日本科学技術研究所 (2010): 平成22年度鏡川清流保全環境調査業務委託 ダム上流アユ由来判別調査. 西日本科学技術研究所, 高知, 10 p.
- 西日本科学技術研究所 (2014): 平成26年度鏡川清流保全環境調査業務委託 アユ遡上状況調査. 西日本科学技術研究所, 高知, 23 p.
- 西日本科学技術研究所 (2015): 平成27年度鏡川清流保全環境調査業務委託 アユ遡上状況調査. 西日本科学技術研究所, 高知, 19 p.
- 西日本科学技術研究所 (2016): 平成27年度鏡川清流保全環境調査業務委託 アユの産卵場調査. 西日本科学技術研究所, 高知, 9 p.
- 農林水産省 (2011): アユ疾病に関する防疫指針. アユ疾病対策協議会, 1–35.
- 岡村 収・為家節弥・青木博幸 (1976): 鏡川の生物と環境に関する総合調査 鏡川の魚類. 高知県, pp. 81–122.
- 岡村 収・碓井利明・宮原 一・山下慎吾・和田浩史郎 (1992): 鏡川水系の生物と環境に関する総合調査Ⅱ 鏡川

- 水系の魚類および甲殻類. 高知県, pp. 99–146.
- 大原健一・景山哲史・桑田知宣・海野徹也・古澤修一・吉浦康寿 (2009): リアルタイム PCR を用いたアユ冷水病における *Flavobacterium psychrophilum* の定量性の検討. 日本水産学会誌, **75**, 258–260.
- 清流西城川編集会議 (2008): フィールドガイド清流西城川. 清流西城川編集委員会, 20 p.
- Strepparava, N., T. Wahli, H. Segner and O. Petrini (2014): Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. *BMC Microbiol.*, **14**, 105.
- Sugahara, K., E. Fujiwara-Nagata and M. Eguchi (2010): Dynamics of the bacterial cold-water disease pathogen, *Flavobacterium psychrophilum*, in infected fish organs and rearing water after warmed water treatment. *Fish Pathol.*, **45**, 58–65.
- 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**, 318–323.
- 谷口順彦 (2002): アユの種苗放流と冷水病被害について. 魚病研究, **37**, 220.
- 谷本 剛・竹内 章 (2005): 健全な内水面生態系復元等推進委託事業 海部川における冷水病の感染環解明と防疫対策の検討. 徳島県立農林水産総合技術センター水産研究所事業報告書, 54–58.
- Vatsos, I. N., K. D. Thompson and A. Adams (2003): Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Dis. Aquat. Organ.*, **56**, 115–126.
- Wakabayashi, H. and S. Egusa (1974): Characteristic of myxobacteria associated with some freshwater fish diseases in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **40**, 751–757.
- 吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (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**, 67–71.