

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05731

研究課題名（和文）河川における細菌性冷水病発生源の解明

研究課題名（英文）Investigation on the source of bacterial cold water disease in rivers

研究代表者

間野 伸宏（MANO, Nobuhiro）

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10339286

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、河川で発生しているアユの細菌性冷水病（BCWD）の原因菌（Fp）の由来を特定することを目的とした。2021および2022年の間、調査した河川においてBCWDの発生は殆ど確認されなかった。一方、同河川では、2023年の6月に同病の発生が確認され、Fpがアユの腎臓や脾臓から分離培養された。2021年や2022年は、コロナの蔓延により遊漁者の移動が制限されていたことから、河川におけるBCWDの発生には遊漁者が深く関係しているものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アユの細菌性冷水病は、30年以上にわたり、多くの河川において発生が認められることから、アユの放流種苗やおとりアユを介して原因細菌が河川内に侵襲し、被害をもたらしているものとの仮説をたて、2021～2023年にかけて疫学調査を行った。しかし、同病原因細菌が分離培養されたのは、解禁後の河川で採捕したアユからのみであった。解禁後は多くの遊漁者が河川内で釣りを楽しむ状況からみて、今後、遊漁者と原因細菌の関係を分析する必要があり、結果次第では、遊漁業界への啓蒙活動に利用できるような成果になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to determine the origin of the causative organism (Fp: *Flavobacterium psychrophilum*) of bacterial cold water disease (BCWD) in riverine ayu (*Plecoglossus altivelis*). During 2021 and 2022, few outbreaks of BCWD were observed in the investigated river. In contrast, an outbreak of BCWD was confirmed in the same river in June 2023, and Fp was isolated and cultured from the kidneys and spleens of ayu fish. Since the movement of recreational fishermen was restricted by coronas between 2021 and 2022, our results suggest that recreational fishermen were closely related to the occurrence of BCWD in the river.

研究分野：魚病学，魚類免疫学

キーワード：魚病 アユ 細菌性冷水病 疫学調査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌性冷水病（以後冷水病）は、1990年に河川のアユにおいて初めて大量死が報告されて以降、国内のアユ資源に甚大な被害をもたらしている細菌感染症である¹⁾。アユの漁獲量をみると、冷水病発生前は年間約15,000トンあったのに対し、現在は約2,500トンと30年間で5分の1まで減少しており、冷水病が主要な減少要因であると考えられている。アユは河川の遊漁において最も人気のある魚種であるが、最近では夏季にエドワジエラ・イクタルリ感染症の発生もみられるなど²⁻⁴⁾、これら細菌感染症の発生に伴う漁獲量の減少は遊漁者の減少に直結し、地域経済にも強い負の影響を及ぼしている。このような状況を背景に、冷水病に対してはワクチンや抗病性育種アユの開発などが試みられてきたが、その被害抑制に成功しているとはいえない。

上記背景を基に、現在、冷水病の発生源（感染ルート）を特定・遮断することで被害を抑制する方策が模索されている。感染ルートとして最も有力視されているのは、同病がアユ放流河川で発生していることから、冷水病原因細菌（以後Fp）を保菌した放流アユがFpの適水温の時期に発症しているとの仮説である。また、アユ釣り解禁後の6月に冷水病の発生がみられることから、おとりアユも発生源として疑われている。

2. 研究の目的

1. の背景を基に、本研究では、河川における冷水病の発生源（感染ルート）解明を目的として、まずアユ由来生物添加培地を用いることによりFpの増殖性や代謝を向上させ、分離培養効率を向上させる手法開発を試みた。また、先行研究³⁾において毎年冷水病の発生が確認されていたモデル河川で採捕されたアユ、放流種苗、おとりアユ、およびその他魚種を供試魚とし、上記培養法を用いてFpの分離培養を行った。そして、同河川で冷水病に罹患していたアユから分離されたFpと遺伝子型が一致するFpを見出すことで、冷水病の発生源特定を目指した。

3. 研究の方法

(1) アユ由来成分を使用した分離培地の検討

Fpの分離培養効率向上を目的として、先行研究〔基盤研究(C)：17K07920〕に基づき調整した筋肉抽出物をFpの培養液に加え、Fpの増殖や代謝（テトラゾリウム塩還元能）に及ぼす影響を解析した。

(2) アユからのFp分離および比較

冷水病の既発水域である都内のモデル河川³⁾を対象として、5～9月にかけて毎月1～数回、アユのサンプリングを行い（図1）、アユ由来成分添加培地を用いてFpの分離培養を実施した。またFpの分離効率向上を目的として、得られた魚体を45L循環式水槽で一定期間飼育してから検査を行う、ストレス飼育後に同検査を実施した。分離培養に用いた全ての魚体からは脾臓および腎臓を摘出し、常法に従い特異的PCRも行った。比較対象として、アユの放流種苗、おとりアユ、およびアユ以外の魚種でも上記調査を実施した（放流種苗については、モデル河川では複数の系統の人工種苗を複数回に分けて放流していたため、系統毎に少なくとも毎年1回は検査を行った）。

Fp様コロニーの発育が認められた場合は純粋培養後、特異的PCRによりFpであることを確認し、PCR-RFLP解析により遺伝子型を解析した。またアユについては、冷水病の症状を示し、更に同個体から培養法または特異的PCR陽性を示したものを冷水病発症魚とした。

Fp様コロニーの発育が認められた場合は純粋培養後、特異的PCRによりFpであることを確認し、PCR-RFLP解析により遺伝子型を解析した。またアユについては、冷水病の症状を示し、更に同個体から培養法または特異的PCR陽性を示したものを冷水病発症魚とした。

(3) アユの由来および生活史履歴の解析

(2)の解析に使用したアユを用いて由来解析を実施した。すなわち、側線横列鱗数や耳石の形態観察により天然と人工種苗を識別した。また、筋肉組織を採取して安定同位体比分析を行うことで、分析魚体の生活史履歴を推定した。

4. 研究成果

(1) アユ由来成分を使用した分離培地の検討

増殖速度、CFU、およびテトラゾリウム塩（WST-8）の還元能を指標として、最もFpの分離培養効率向上が期待されるアユ生体成分および平板培地の組み合わせを検討し、アユの筋肉抽出物およびFLPA培地の組み合わせが最も適切であると判断した。そこで同培地を用いてFpの分離効率を検討したところ、比較対象培地とした改変サイトファーガ平板培地に比べ20～30%高

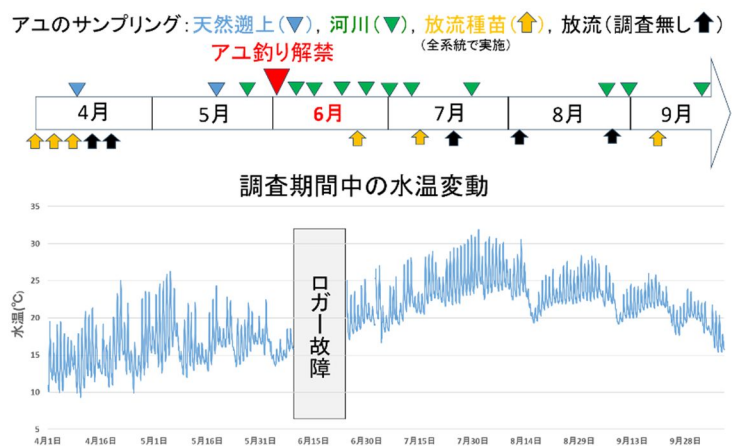


図1: 2023年のサンプリングスケジュールとモデル河川の水溫。

い割合で Fp を分離培養することができた。しかし、いずれも冷水病発症時期の解禁後 6~7 月の魚体からであり、4 月に放流用の人工種苗や解禁前の魚体からは Fp を分離培養することができなかった。

(2) モデル河川における冷水病の発生および Fp の保菌状況

モデル河川では、2021 および 2022 年は解禁後 (6~7 月) に冷水病の発生が確認されなかったのに対し、2023 年は同病の発生が僅かに観察された。

(1) で確立した手法を用いて Fp の分離培養を検討した結果、全ての年で、解禁前に得た放流種苗、遡上アユ、河川採捕アユ、その他魚種 (8 科 16 属 17 種 : 370 尾) から Fp を分離培養することができなかった。また、冷水病の発生が確認されなかった 2021~2022 年は解禁後も分離培養された Fp は少なく、2023 年のみ 60 株得られた。2023 年 6~7 月の保菌率および発症率は、それぞれ 16.7~35.4%、1.7~7.3% であった (表 1)。なお、2022 年の夏季に得たアユ以外の複数魚種からは Fp が分離培養されたが、秋季から冬季にかけては 3 年間の調査期間においてアユならびにその他魚種から Fp は分離培養されなかった。得られた Fp を用いて PCR-RFLP 解析を行ったところ、全て遺伝子型 A-S-QR-C であった。

表 1: 2023 年度 河川採捕アユ & 天然遡上アユの検査結果 (培養法)

由来	4月	5月	6月	7月	8月	9月	
通常検査	河川採捕アユ		0(0/21)	34.3(33/96) 5.2(5/96)	16.7(10/60) 15(9/60)	0(0/27)	33.3(3/9)
	天然遡上アユ	0(0/20)	0(0/30)				
ストレス 飼育検査	河川採捕アユ		0(0/10)	0(0/41)	21.4(3/14)	0(0/8)	
	天然遡上アユ	0(0/10)	0(0/10)				

上段: 保菌率 (症状無し & Fp 陽性個体数 / 検査個体数)

下段: 発症率 (症状有り & Fp 陽性個体数 / 検査個体数)

脾臓や腎臓から抽出した DNA を鋳型とした Fp の特異的 PCR では、解禁前のいずれの由来のアユおよびその他魚種でも陽性反応を示す個体が確認された (表 2)。一部の PCR 産物については DNA シークエンス解析を行い、Fp の配列情報と一致した。また大部分の PCR 産物を用いて PCR-RFLP 解析を行ったところ、その他魚種の PCR 陽性産物の一部も A 型 (アユ型) を示した。

表 2: 2023 年度 河川採捕アユ & 天然遡上アユの検査結果 (PCR 法)

由来	4月	5月	6月	7月	8月	9月	
通常検査	河川採捕アユ		19(4/21)	25(24/96) 3.1(3/96)	25(15/60) 16.7(10/60)	26(7/27)	11.1(1/9)
	天然遡上アユ	10(2/20)	3.3(1/30)				
ストレス飼育 検査	河川採捕アユ		30(3/10)	26.8(11/41) 2.4(1/41)	42.9(6/14)	50.0(4/8)	25(2/8)
	天然遡上アユ	30(3/10)	20(2/10)				

上段: 保菌率 (症状無し & Fp 陽性個体数 / 検査個体数)

下段: 発症率 (症状有り & Fp 陽性個体数 / 検査個体数)

(3) アユの由来および生活史履歴

河川採捕アユの形態解析を行い人工種苗と天然遡上に識別した結果、いずれの年も 90% 以上が人工種苗であった。

採捕したアユの生活履歴を推定するため、安定同位体比分析を行った結果、放流前の人工種苗は個体差が少なく、炭素安定同位体比は 18~17‰、窒素安定同位体比は 9~14.5‰ であったのに対し、河川で採捕したアユの炭素安定同位体比は 20~13‰、窒素安定同位体比は 3~14‰ であり、解禁後の 6~7 月にかけて、炭素安定同位体比が高く窒素安定同位体比が低いグループおよび放流直後の人工種苗由来と考えられる炭素安定同位体比が低く窒素安定同位体比が高いグループの 2 グループが認められた。上記結果に Fp の検査結果を組み合わせると、両グループで保菌および発症個体が観察された (図 2)。

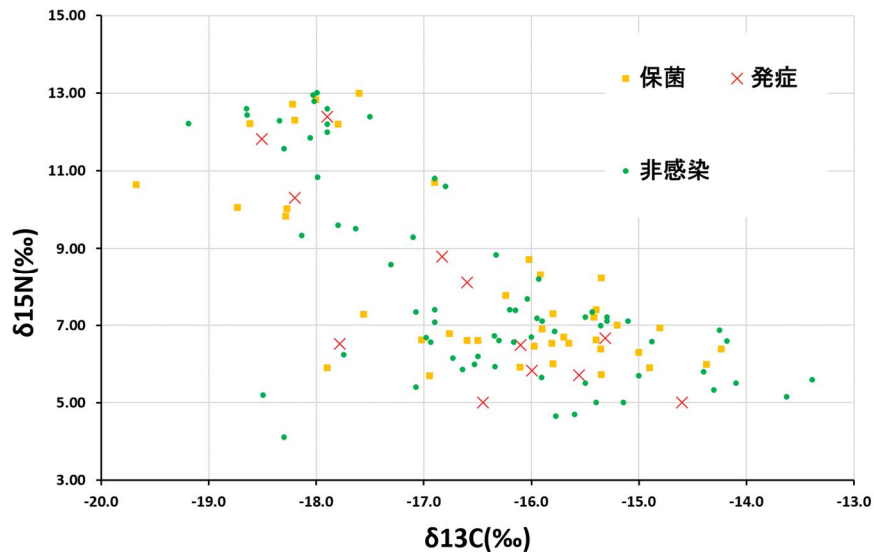


図 2: 2023 年のサンプリングスケジュールとモデル河川の水質。

(4) 総括

本研究の結果、PCR 法ではいずれの年も年間を通して、アユおよびその他魚種において Fp の保菌が確認された。しかし、培養法では解禁後の 6~7 月に河川で採捕されたアユにおいてのみ保菌魚が確認され、冷水病の被害は、モデル河川では 2023 年のみしか認められなかった。PCR 陽性魚については、新規培養法でも同陽性を示した魚体の臓器から Fp を分離培養することはできなかったことからみて、生きてはいるけれども培養できない viable but non-culturable (VBNC) 状態であると推察された。また、形態からみて、モデル河川で認められたアユの大部分が放流された人工種苗であり、安定同位体比の解析結果から、放流直後の個体も Fp を保菌・発症しているものと推定された。冷水病の発生が認められなかった 2021~2022 年はコロナによる影響で遊漁者の移動が制限されていた年代であった点からみて、冷水病の発生に遊漁者または遊漁者が持ち込むおとりアユが関係していることを示唆している。水中での魚病細菌を正確に捉える手法の開発も進んでいることから⁴⁾、解析対象河川を増やし、遊漁者と Fp の関係解析を進める必要がある。

< 引用文献 >

- 1) 熊谷明(2016): 細菌性冷水病. 魚病研究, 51(4), 153-157.
- 2) H. Takeuchi, M. Hiratsuka, K. Hori, H. Oinuma, Y. Umino, D. Nakano, M. Iwadare, R. Tomono, T. Imai, H. Mashiko, A. Namba, T. Takase, S. Shimizu, T. Nakai, N. Mano (2021): Environmental factors affecting *Edwardsiella ictaluri*-induced mortality of riverine ayu, *Plecoglossus altivelis* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 44, 1065-1074.
- 3) H. Takeuchi, M. Hiratsuka, H. Oinuma, Y. Umino, D. Nakano, M. Iwadare, R. Tomono, K. Hori, T. Imai, T. Ishikawa, A. Namba, N. Takai, T. Ryuu, H. Maeda, T. Nakai, N. Mano (2016): Infection Status of Ayu and Other Wild Fish with *Flavobacterium psychrophilum* and *Edwardsiella ictaluri* in the Tama River, Japan. *Fish Pathology*, 51(4), 184-193.
- 4) H. Takeuchi, H. Kawakami, N. Mano, H. Yamanaka, S. Shimizu (2023): Environmental DNA-based quantification of *Edwardsiella* bacteria and fish-derived materials in rearing water of infected ayu *Plecoglossus altivelis* and red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Sciences*, 90, 93-103.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間野伸宏
2. 発表標題 安定同位体分析によるアユの由来解析の試み - 河川における細菌性冷水病発生源解明を目指して -
3. 学会等名 令和4年度アユの疾病研究部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 間野伸宏
2. 発表標題 3年間のモデル河川における調査結果を考察する - 河川における細菌性冷水病発生源解明を目指して -
3. 学会等名 令和5年度アユの疾病研究部会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高井 則之 (TAKAI Noriyuki) (00350033)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	
研究分担者	周防 玲 (SUO Rei) (20846050)	日本大学・生物資源科学部・講師 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴崎 康宏 (SHIBASAKI Yasuhiro) (30750674)	日本大学・生物資源科学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関