

アユ冷水病の病原機構の解明 と防除技術の開発

広島県立総合技術研究所
水産海洋技術センター
永井崇裕

業績名 アユ冷水病の病原機構の解明と防除技術の開発
所 属 広島県立総合技術研究所 水産海洋技術センター 水産研究課
研究者 副主任研究員 永井 崇裕

背景と目的

アユの冷水病(細菌性疾病)

- 1990年代前半から全国のアユに蔓延
広島県では1993年に河川で確認
- 環境中に生存しやすい*Flavobacterium psychrophilum*
が原因となる細菌性疾病
- 養殖場だけでなく河川でも死亡を引き起こす
- 河川におけるアユ漁獲不振の一因



アユ冷水病の病原機構の解明と
防除技術の開発を目的とした

アユの冷水病は1990年代前半からアユに蔓延している細菌性疾病である。
広島県では1993年に河川のアユで発生が確認された。
河川環境中に生存しやすいフラボバクテリウム・サイクロフィラムが原因となる病気である。

この病気の特徴は、養殖場だけでなく、河川でも発生し大量死を引き起こすことである。
河川でアユが大量死することから、河川においてはアユ漁獲不振の一因となっている。
本研究では、アユ冷水病の病原機構の解明と防除技術の開発を目的とした。

研究内容

1. アユ冷水病菌の病原機構

- ① 病原因子の検討
- ② 異なる病原型の発見
- ③ 菌株の病原性の変化



2. 冷水病に対する耐性を持つアユ系統

- ① 人工アユにおける冷水病感受性の差の検討
- ② さらに冷水病に強いアユの開発

3. 冷水病ワクチンの開発

- ① 自然感染による不活化ワクチンの有効性評価
- ② 浸漬ワクチンの有効性を高める技術の開発

研究内容（発表内容）の概要である。

1.アユ冷水病菌の病原機構の解明

- 冷水病菌 *F. psychrophilum* はサケ科魚類の冷水病の原因菌として世界的には知られている
- 国内でも *F. psychrophilum* はサケ科魚類, コイ科魚類, アユから分離され, 遺伝子型の違いが示されている (Izumi *et al.*, 2003 等)
- アユの冷水病菌と他魚種の冷水病菌の病原機構の違いは明らかではない



冷水病菌の血清抵抗性(増殖性)に着目

最初に、アユ冷水病菌の病原機構の解明について説明する。

フラボバクテリウム・サイクロフィラムは元々サケ科魚類の冷水病の原因菌として世界的には知られていた。

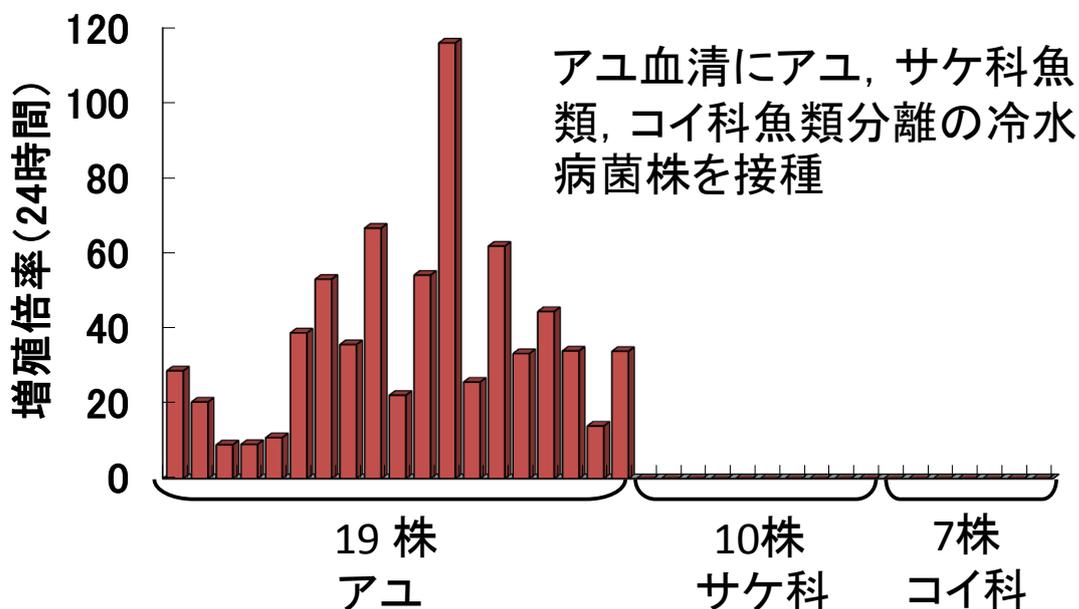
日本ではサケ科魚類、コイ科魚類、アユから分離されている。

アユの菌と他魚種の菌は遺伝子型が異なることが示されている。

しかし、アユの菌と他魚種の菌の病原機構の違いは明らかになっていない。

冷水病菌のアユの血清に対する抵抗性、増殖性に着目して病原機構を検討した。

①冷水病菌のアユ血清に対する抵抗性



アユから分離した冷水病菌はアユ血清で増殖する

アユ、サケ科魚類、コイ科魚類から分離された冷水病菌をアユ血清に接種して、増殖するかどうかを調べた。

サケ科魚類やコイ科魚類由来の菌株はアユ血清中から検出されなくなる、つまり血清成分により殺菌されることが示された。

しかし、アユ由来の菌株はアユ血清中で殺菌されるよりも、むしろ増殖することが示された。

ここでは結果を示さないが、同じ実験をアマゴの血清を用いて行った。

アユ由来の菌株はすべてで増殖が認められなかったが、サケ科魚類やコイ科魚類由来の菌株は一部で増殖が認められた。

①冷水病菌の病原因子

分離菌の由来	アユに対する病原性	アマゴに対する病原性
アユ	有	無
サケ科, コイ科	無	有(一部)

分離菌の由来	アユ血清での増殖性	アマゴ血清での増殖性
アユ	有	無
サケ科, コイ科	無	有(一部)

血清抵抗(増殖)性は冷水病菌の病原因子の一つである

病原性試験の結果と、血清増殖性試験の結果を表にまとめた。

アユ由来の菌株はすべてアユに対する病原性を持ち、アユ血清で増殖した。

一方、これらの菌株はすべてアマゴに対する病原性はなく、アマゴ血清でも増殖しなかった。

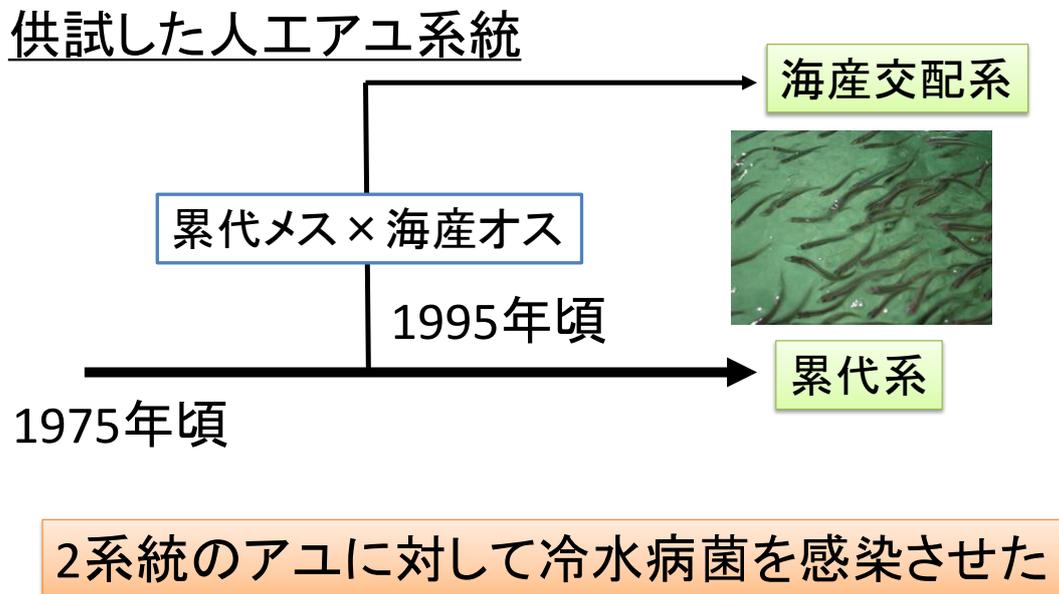
さらに、アユ以外のサケ科やコイ科魚類由来の菌株はすべてアユに対する病原性はなく、アユ血清で増殖できなかった。

一方、これらの菌株のうちアマゴに対して病原性を持つ一部の菌株はアマゴ血清で増殖した。

これらの結果から、冷水病菌の血清抵抗性が冷水病菌の病原因子の一つとして考えられた。

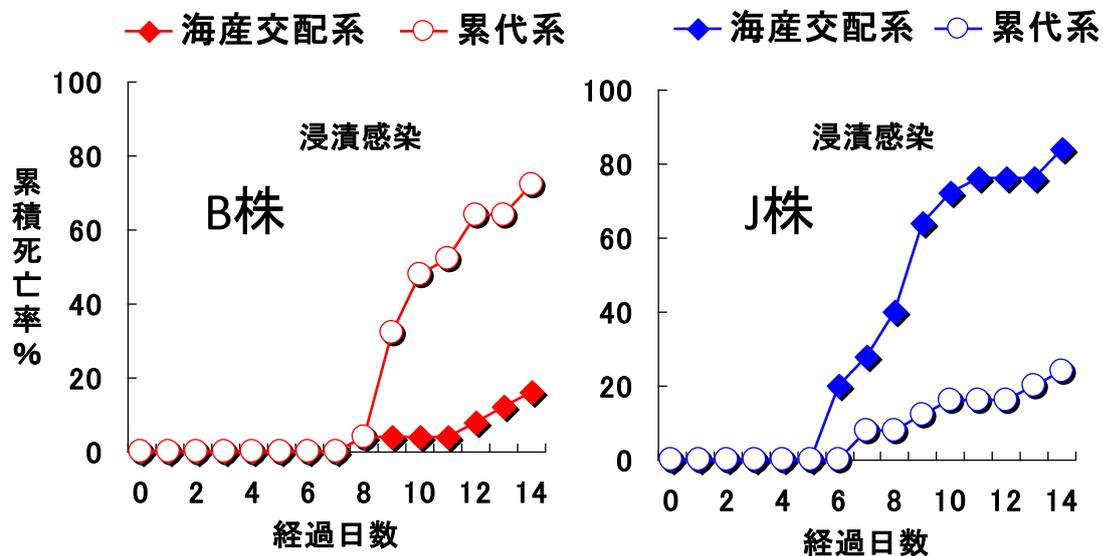
冷水病菌の魚種特異性が血清抵抗性と強く関連していた。

②冷水病菌の異なった病原型



次に、冷水病菌の異なった病原型について説明する。
実験にはここに示す2系統の人工アユを用いた。
この2系統のアユに対して冷水病菌を感染させた。

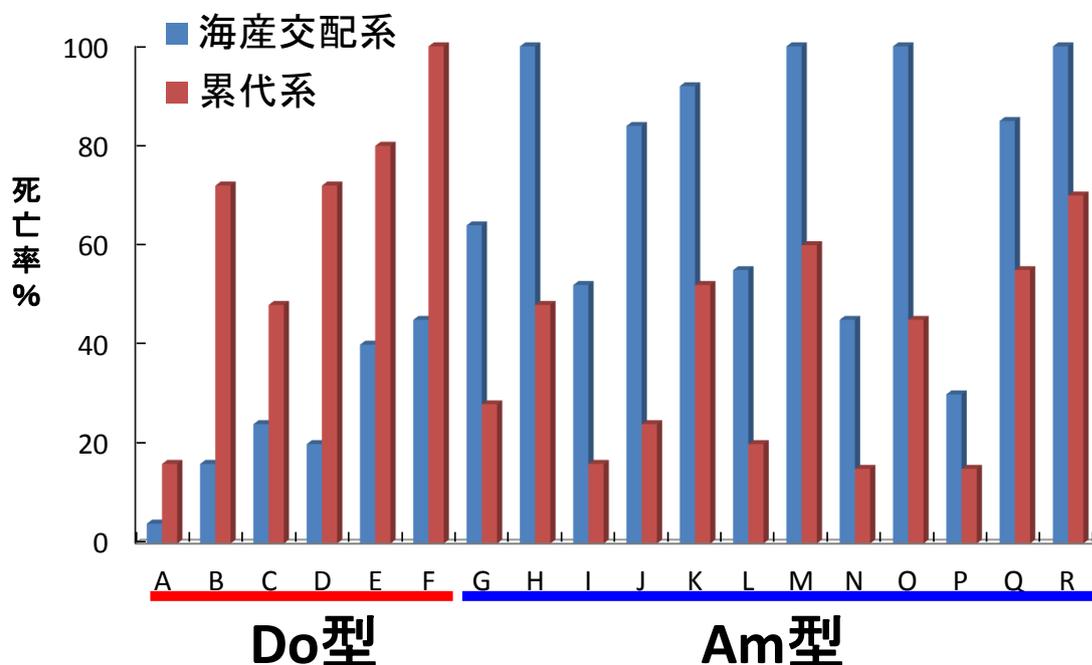
②冷水病菌の異なった病原型



病原性が全く異なる冷水病菌の病原型を見出した

この図では、異なる病原型を持つB株とJ株を用いた浸漬感染実験の結果を示す。
B株では海産交配系よりも累代系の死亡率が高かった。
しかし、J株ではB株とは全く異なり、累代系よりも海産交配系がより死亡している。
このように病原性がアユ系統により全く異なる冷水病菌の病原型を見出した。

②複数の株を用いた浸漬感染実験



過去に分離されて保存されている複数の冷水病菌株を用いて、同様に浸漬感染で病原性を調べた。

A-Fでは海産交配系よりも累代系の方がより死亡している。

一方、G-Rでは累代系よりも海産交配系の方がより死亡する結果となった。

このように複数の株を調べても、2つの型に分かれる結果となった。

累代系により病原性を示すものを、累代系のDomesticatedからDo型と称した。

一方、海産交配系により病原性を示すものを海産交配系のAmphidromousからAm型と称した。

②冷水病の2つの病原型

- ▶2つの病原型に分けられる
 - 累代系に病原性が強い**Do型**
 - 海産交配系に病原性が強い**Am型**
 - ▶自然感染では海産交配系の死亡率が、累代系よりも常に低いことを確認
- Do型の菌株が河川では優勢であることが示唆された

冷水病菌の異なった病原型の発見

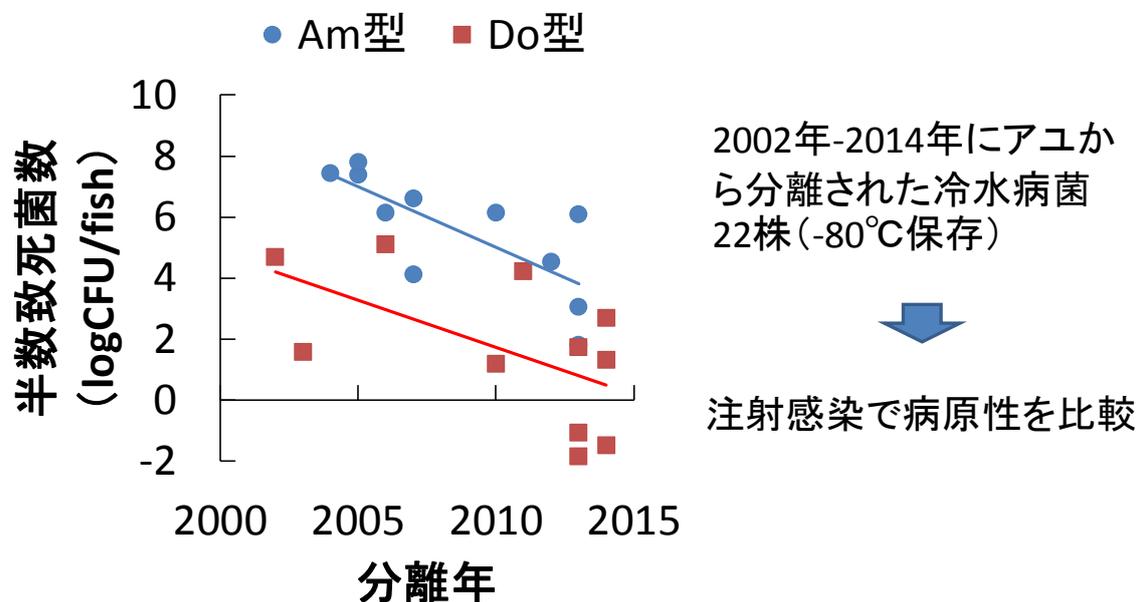
2系統のアユを用いて感染実験を行った結果、冷水病菌には2つの病原型があることが明らかになった。

累代系により強い病原性を持つDo型と、海産交配系により強い病原性を持つAm型である。

しかし、河川水を用いた自然感染試験では海産交配系の死亡率が、毎年、累代系よりも低いことが確認されている。

このことから、河川環境ではDo型の菌株が優勢であることが示唆される。

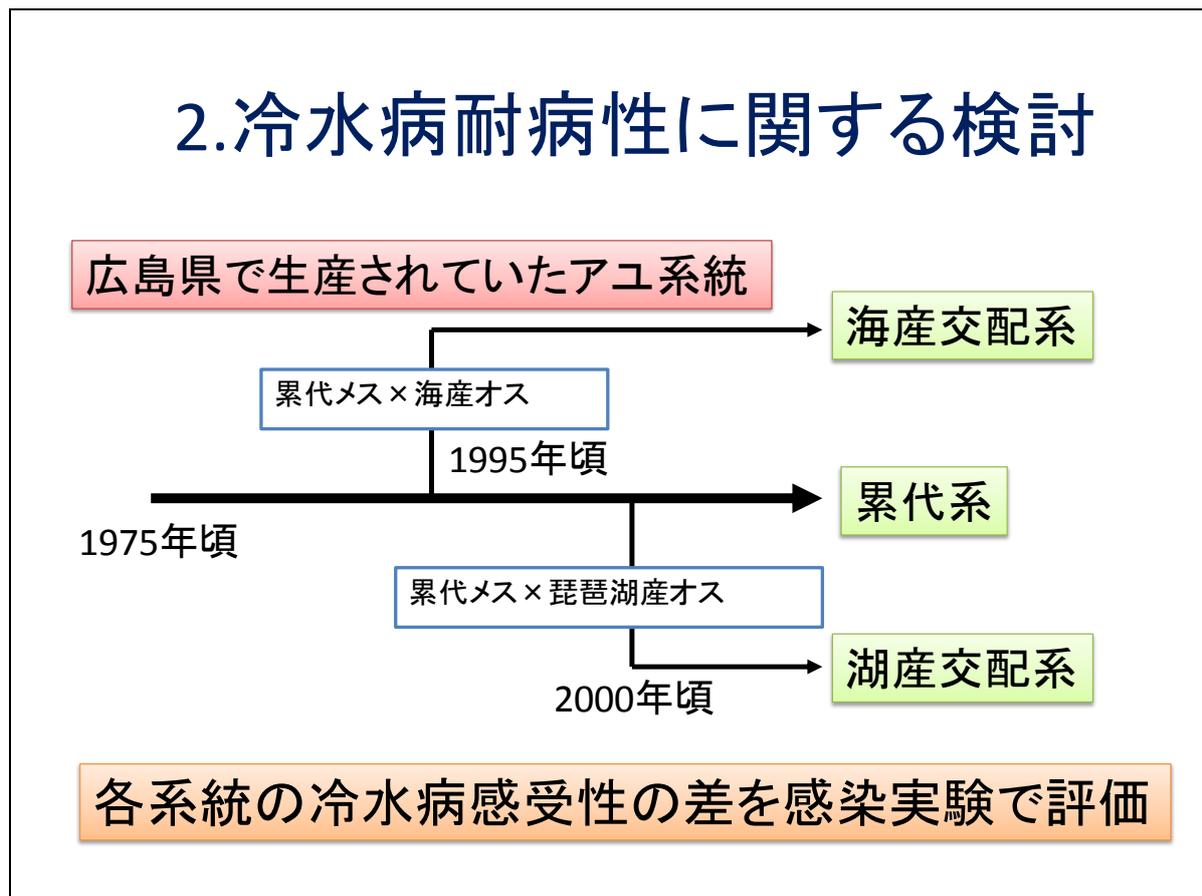
③冷水病菌分離年と病原性の関係



近年の冷水病菌の高病原化が示唆された

次に、保存されていた冷水病菌の分離年と病原性の関係を調べた。
2002年から2014年に冷水病のアユから分離された22株の病原性を、注射感染で検討した。
これらの菌株は-80℃で保存されていて病原性の低下は考えにくい。
また、10回の継代培養を繰り返しても病原性が低下することは認められなかった。
継代培養の影響はないと考えられた。
この図から明らかなように、近年の冷水病菌の高病原化が示唆された。
冷水病に対する防疫対策を引き続き行っていく必要性が強く言える。

2.冷水病耐病性に関する検討



次に冷水病耐病性に関することについて説明する。

この図は、広島県で生産されていた人工アユの系統を示したものである。

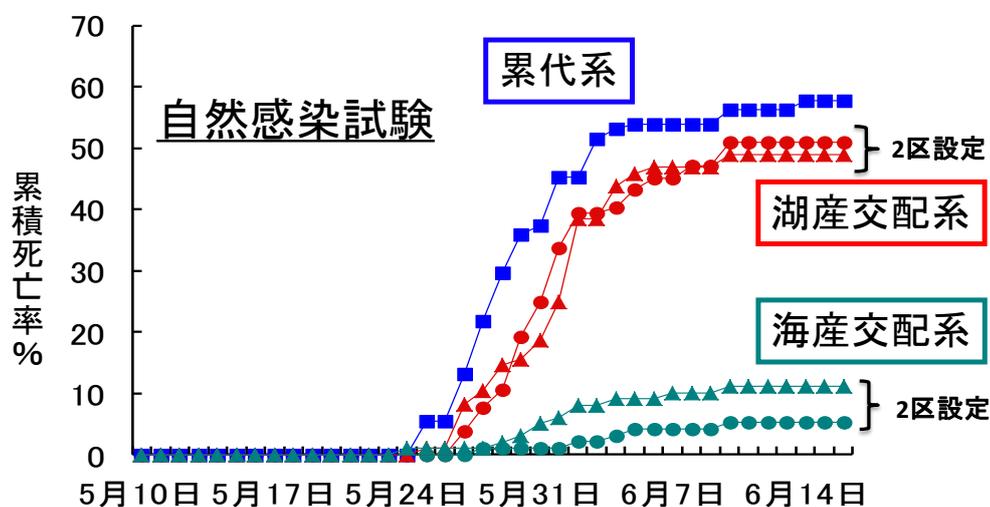
累代系アユは約40年前に太田川で捕獲されたアユを親に用いて作られたアユを継代してきたものである。

海産交配系アユは、累代系のメスに、鹿児島県産アユのオスを掛け合わせて作られたアユである。

湖産交配系アユは、累代系のメスに琵琶湖産アユのオスを掛け合わせて作られたアユである。

これらのアユの冷水病感受性の差を感染実験で評価した。

①アユ系統における冷水病感受性の差



海産交配系は明らかに冷水病感受性が低い

アユ系統による冷水病感受性の差を明らかにした

河川水を用いた屋外の池でアユを飼育すると、冷水病の発生が必ず見られる。

冷水病の発生は例年、5月中旬以降から確認される。

飼育履歴が全く同じ3系統のアユをこの屋外池で飼育した。

その結果、海産交配系アユは累代系、湖産交配系よりも明らかに死亡率が低かった。

このことから、海産交配系は冷水病に対して強いことが示された。

ここでは、自然感染による結果のみを示しているが、同居感染でも同様の結果となった。

アユ系統による冷水病感受性の差を初めて明らかにした。

②さらに冷水病に強い系統の作出

海産交配系

冷水病に強い
継代化が進む

黒瀬高津系

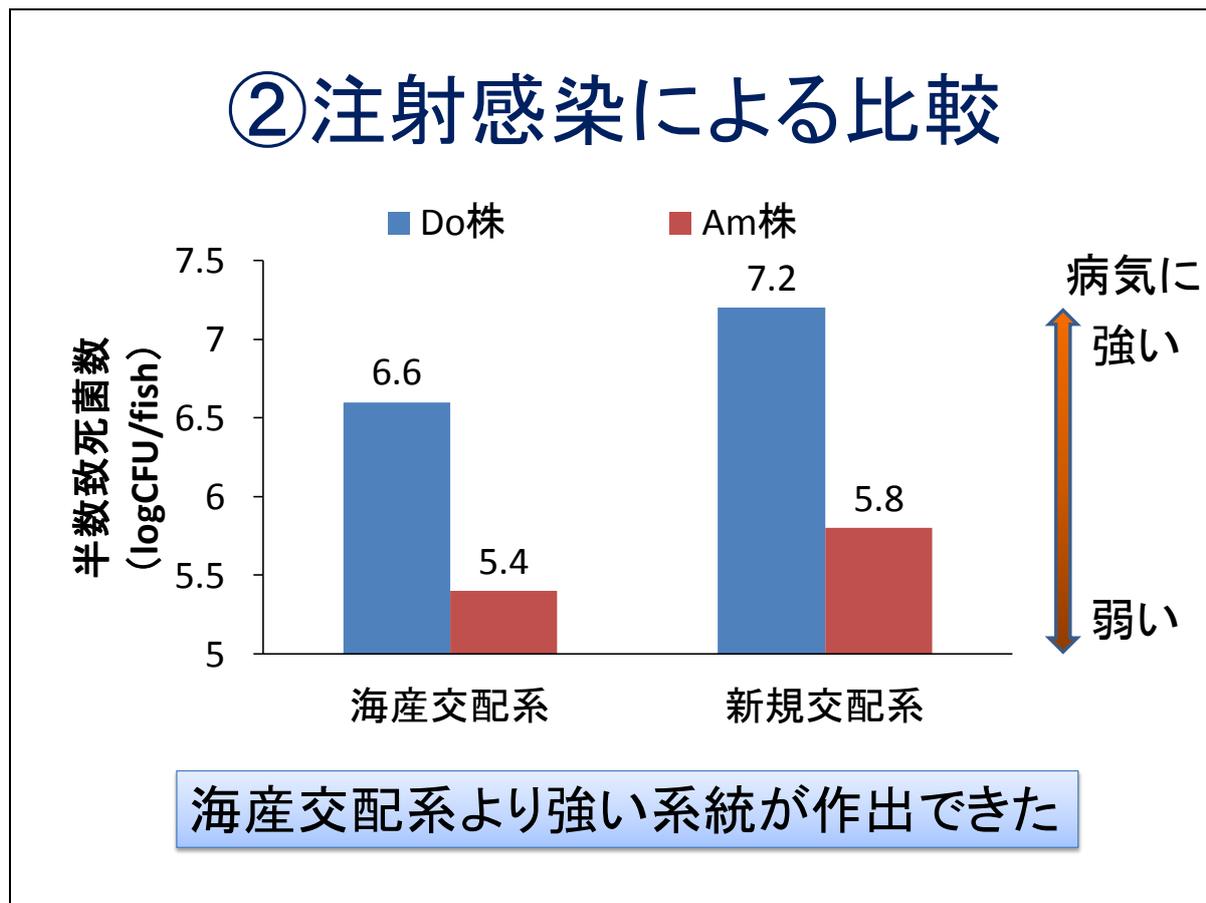
天然に近い性質
飼育しにくい



新規交配系

一代限りで
継代化を避ける
新たな性質を期待

次に、新規交配系アユの作出を広島県栽培漁業協会と共同で行った。
冷水病に強い海産交配系は継代化が進み河川放流に適さないという指摘が増えてきた。
一方、広島県と島根県の川で採取されたアユを親に作った黒瀬高津系は、天然に近い性質を有するが、網ずれなどに弱く飼育しにくい難点があった。
そこで、海産交配系と黒瀬高津系をかけた新規交配系を作出した。
このアユは、一代限りで継代化を避けることができた。
また、F1として出荷することで、広島県の独自品種として管理が可能となった。
この新規交配系の冷水病感受性を調べた。



冷水病菌Do株とAm株を用いて注射感染実験を行った。

半数致死菌数を図に示したが、数値が大きいほど冷水病に強いことを意味する。

新規交配系アユはDo株およびAm株を注射した場合、海産交配系よりも強いことが示された。

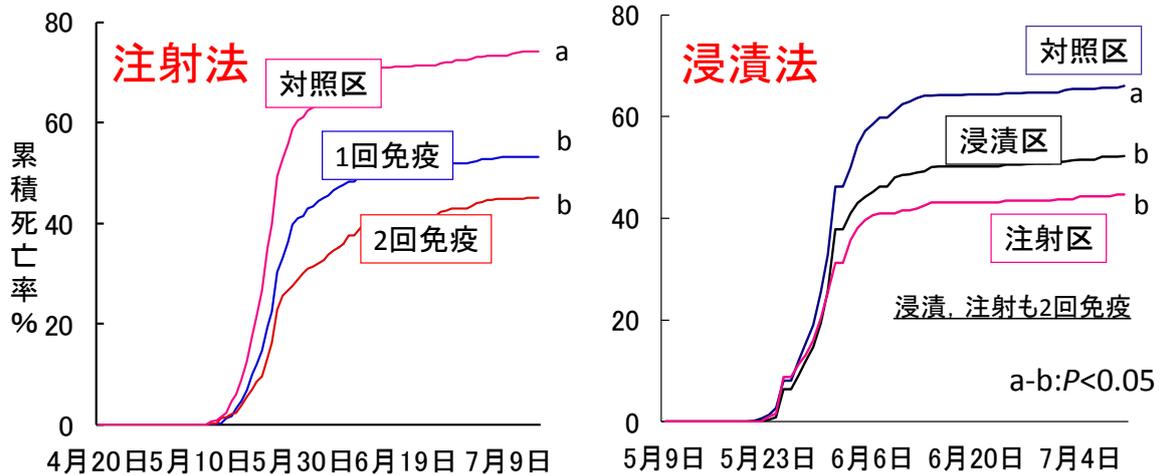
また、網ずれなどに弱い黒瀬高津系よりも、新規交配系は網ずれに強くなり、冷水病に強い以外の性質も得ることができた。

このように、従来の海産交配系よりもより強いアユ系統を作出することができた。

3.冷水病ワクチンの開発

①自然感染による有効性評価

ホルマリン不活化ワクチン:広島県分離株で作製



自然感染によるワクチンの有効性を初めて明らかにした

次に冷水病ワクチンの開発について述べる。

ホルマリン不活化ワクチンには広島県で分離された強毒株を用いた。

この広島県の株と他県の株でワクチンの効果を比較した結果、広島県の株で効果が高かった。

このことから広島県の株は国を含め多くの県で用いられることになった。

このホルマリン不活化ワクチンを用いた自然感染での有効性評価を行った。

先ほどの冷水病感受性試験と同様に河川水を用いた屋外池で免疫したアユを飼育した。左の図に示すように注射ワクチンは1回免疫よりも2回免疫の効果が高かった。

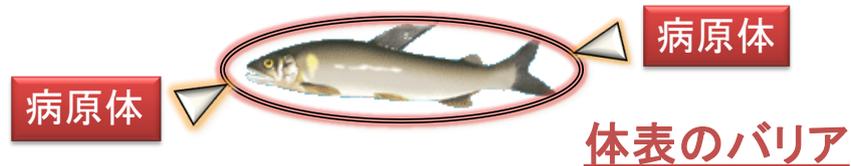
自然感染におけるホルマリン不活化ワクチンの効果を初めて明らかにした。

右の図は注射ワクチンとより実用化に近い浸漬ワクチンの効果を同様に示したものである。

浸漬ワクチンも注射ワクチンに効果は劣るが、自然感染での有効性が初めて明らかになった。

このようにホルマリン不活化ワクチンによる冷水病対策の可能性が示された。

②浸漬ワクチンの有効性を 高める技術の開発



魚は病原体の侵入を阻止するために
体表をバリア(粘液など)で覆っている



バリアによりワクチン成分の取り込みが阻害される

タンパク質分解酵素液に魚を浸漬しバリアを一時的に除去



ワクチン成分の取り込みが促進されるのではないかと？

しかしながら、ホルマリン不活化ワクチンを用いた浸漬ワクチンでは有効性が十分でなく、実用化は難しかった。

そこで、新たな浸漬ワクチンの有効性を高める技術の開発を行った。

ここでは酵素を用いたワクチンの有効性を高める方法の説明をする。

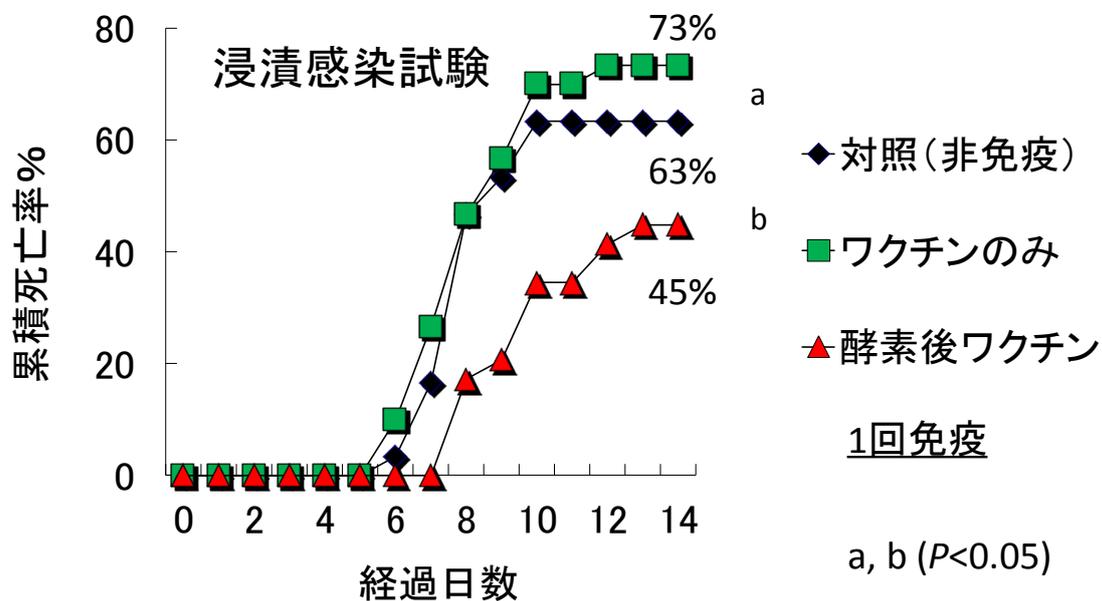
魚の体表には環境中の病原体の侵入を防ぐ体表のバリアがある。

体表バリアがワクチン成分の取り込みを阻害しているのではないかとこの発想を持った。

そこでタンパク質分解酵素液にアユを一時的に浸漬することでバリアの一時的除去を試みた。

このことでワクチン成分の取り込みが促進されるのではないかと考えた。

②浸漬ワクチンの有効性向上



酵素の事前処理で浸漬ワクチンの有効性が向上

実際に試験した結果を示す。

対照区や浸漬ワクチンのみの試験区と比較して、酵素処理後に浸漬ワクチンしたアユの死亡率が低かった。

酵素処理によって浸漬ワクチンの有効性が向上することが示された。

実験で用いた酵素は食品加工用の酵素製剤で、比較的薄い濃度で用いることからコスト面および食品としての安全性では問題ないと考えられた。

また、感染実験を行った結果、体表のバリアは1日程度で回復するので、アユに対するダメージも比較的少ないと考えられた。

この技術は2012年に特許出願を行った。

波及効果

- 人工系統間の冷水病感受性の差を明らかにしたことで、冷水病感受性の低いアユが広島県栽培漁業協会において種苗生産され、広島県各地の河川に放流されている。
- また、他県でも同様の取り組みが行われている。
- 酵素を利用した冷水病浸漬ワクチンの効果を高める技術を開発したことで、この技術を用いたアユ以外の海産魚のワクチン開発が動物用医薬品メーカーと共同で行われている。

人工系統間の冷水病感受性の差を明らかにしたことで、冷水病感受性の低いアユが一般社団法人広島県栽培漁業協会生産され、広島県各地の河川に放流されている。

詳細は触れなかったが、広島県内の河川に従来のアユと冷水病感受性の低いアユを標識して放流し調査を行った。

友釣りや網漁などで漁獲したが、冷水病感受性の低いアユが従来のアユより多く漁獲される結果が得られている。

さらに、他県でも種苗間の冷水病感受性を比較するなど同様の取り組みが行われている。

一方、酵素を利用した冷水病浸漬ワクチンの効果を高める技術を開発したことで、この技術を用いたアユ以外の海産魚の浸漬ワクチンの開発が動物用医薬品メーカーと共同で行われている。

まとめ

- アユ冷水病菌の病原因子の一つが、アユ血清に対する抵抗性であることを見出した。
- アユ冷水病菌には、異なる病原型が存在することを見出した。
- 近年の冷水病菌の高病原化を示唆した。
- 人工アユ系統間における冷水病感受性の差を明らかにし、より強い系統の作出を行った。
- 冷水病のホルマリン不活化ワクチンの効果を明らかにし、また、浸漬ワクチンの効果を高める技術を開発した。

謝辞

本研究は以下の皆様の協力により行われました。
この場を借りてお礼申し上げます。

- ◆アユの種苗生産や交配などに協力して頂いた(一社)広島県栽培漁業協会の職員の皆様
- ◆自然感染実験に協力して頂いた養殖場の皆様(守下さん)
- ◆冷水病菌株の収集などで協力いただいた養殖場や内水面漁業協同組合の職員の皆様
- ◆供試魚の飼育や感染実験, その他の実験に多大に協力して頂いた当センターの内水面担当の非常勤職員の皆様(濱田さん, 駒井さん, 中野さん)

[関係質疑]

鹿児島県（水産技術開発センター 佐々木所長）

酵素を用いたワクチンの海産魚の利用ということで、当県では海産魚の養殖が盛んで期待している。

1 つだけお聞きしたのが、ワクチンの効果が 2 回免疫する方が効果は高くなっているが、酵素を使った免疫では 1 回だけの結果しか示されていない。酵素でも 2 回すると効果が向上するのか、それとも 1 回で十分な免疫ができるのか？

→アユの場合は、そもそも効果が低いので酵素処理を 2 回するとよく効く。

ワクチンがよく効く魚種なら酵素は 1 回でもよく効くと思う。