

表 4 放流河川における保菌状況の変化

時期	魚種	ロット数(群)	ロットあたりの尾数(尾)	1st PCR (陽性/陰性)	Nested PCR (陽性/陰性)	RFLP	備考
放流時	アユ	6	6	0/6	0/6		
	イワナ	1	4	0/1	1/1	B型	
	ヤマメ	3	2-5	0/3	1/3	B型	
	ウグイ	5	4-5	0/5	1/5	B型	
	カジカ	4	5-6	0/4	3/4	B型	
ギバチ	1	1	0/1	0/1			
解禁直前	アユ	10	6	0/6	2/6	A型	
	藻類	9地点	1地点	0/9	0/9		藻類
解禁後	アユ	11	1	2/11	9/11	A型	病魚

III 検出された冷水病菌の配列比較

材料および方法

試験には保存菌株（アユ由来 6 株，ニジマス由来 3 株）および県内河川の病魚（5 河川；外見からすべて放流魚と判断された）から抽出した DNA を用いた。試験 I と同様の手法で冷水病菌の遺伝子型を調べた後、試験 I，II にて 1st PCR で冷水病菌が検出されたサンプルと併せて塩基配列の解析に用いた。FPS-1 の増幅配列を挟み込むように設計したプライマー（FPSW，表 1）を用いて、表 5 に示す PCR 条件により増幅産物を得た後、武田⁶⁾に従いシーケンスを行い、塩基配列を決定した。得られた配列は NCBI に AB254195.1 として登録されている A 型の配列（以下、登録配列）と比較した。

表 5 FPSW を用いた PCR の反応液組成および反応

Sample DNA	1 μl	温度	時間
Primestar Premix	5 μl	95°C	1min
F+R primer (10 μM each)	0.3 μl	95°C	10sec
		56°C	15sec
DDW	3.7 μl	68°C	60sec

) ×35

結果および考察

RFLP 解析の結果、河川の病魚から得られた冷水病菌は全て A 型であった。一方で保存菌株では、ニジマス由来の 3 株は全て B 型であったが、アユ由来 6 株のうち 4 株は A 型であったが 2 株は B 型と判定された。

配列解析では、RFLP 解析により A 型と判定された 10 サンプルのうち、7 サンプルが登録配列と同じ配列であった（以下、A-1）。A-1 の配列を図 1 に、変異箇所および置換された配列を表 6 に示す。3 サンプルは A-1 と 1 塩基の置換のみが確認され（以下、A-2）、本試験での解析領域にほとんど変異がないことが示された。B 型と判定された 6 サンプルのうち、ニジマスの 3 菌株と釣獲魚 1 サンプルの配列は同一で、釣獲魚の冷水病菌はそれら由来の可能性はある。残る 2 サンプルは A 型と B 型の間隔的な配列を示した（以下、AB）。発症したアユからもしばしば B 型が分離されるが、¹⁾ いわゆるマス類の B 型ではなく、アユに病原性を有する新しい遺伝子型と判断するべきかもしれない。アユから分離された冷水病菌を対象とした RFLP 解析によ

り B 型と判断された際は注意する必要がある。

```

AGTANGAAGAGTTTTCCTGAAAAACAATGGGAAATTAAGTTACGTAATGGCGATG
ACCAGCTAATTAATATAATTAAGGAAGACCCGCACTTGGCAACACCCAGCAATTTTAA
ATGCTCGAGGAAAATCGCAAGGCAAAAATTAAGCAGCATTACTACGCAAAAAGAG
GTAGCCGAGAGCAATGGGAAAATGGTTAGAAGACGAAAAAGAAATCATGCAAAAGTCA
AAGAACAAATGTCATACCATGATACAGTCAGGTTTATACACACAGCAGCAAGCAAA
AGTTTAACTACGAATTAAGAAAATAACAAGTTTACCTTCGATGATGTTCTGTGCAAT
CAACTATCGAAGCAAAAAGTAGAACTACAGATGCGGAACATAACGCTTTATGAAAA
AAGACGAAAAAGATATAAAGCAGAGCAATCTCGTGAATTAGAATATGTTTGTAGAAG
ACAAAGCATCAGCAGAGACAAAAAAATAATAGAGATAAAGTAAACGGATTATTAATC
CGTTGCGAGCAATCCAGTAACTACAAACCTAAACGAAAGCAAGTGGATTTAAAAAGG
CTTCATTTAGTAGAATTTTATAAGTCAATTCAGATATAAATAAGCAATCTACCTATG
ATTTCTAAAAAGATTTGCGAGTAGAATCGAGAGGATTTAATTAGCACCCAGGAC
AATTTACGGACCATATATGTTTGGGATTAACGCTGATTAACAAAAATTTAGGAAGAA
AGTAAACGCAATGCAAAAGTAGTCATAT
    
```

図 1 遺伝子型 A-1 の塩基配列

太字は変異がみられた箇所を、枠内は FPS-1 による増幅領域を示す

表 6 各遺伝子型の由来と変異箇所

RFLP	由来		変異箇所						遺伝子型
	魚種	由来：サンプル数	1	2	3	4	5	6	
塩基	A	アユ 河川病魚:4 / 保存菌株:3	T	C	T	A	A	G	A-1
	A	アユ 河川病魚:1 / 保存菌株:2	-	-	-	-	-	A	A-2
	B	アユ 保存菌株:2	A	-	C	-	-	-	AB
	B	アユ・ニジマス 釣獲魚:1 / 保存菌株:3	A	T	C	T	G	-	B
アミノ酸	A	アユ 河川病魚:4 / 保存菌株:3	D	-	S	E	N	-	A-1
	A	アユ 河川病魚:1 / 保存菌株:2	-	-	-	-	-	-	A-2
	B	アユ 保存菌株:2	E	-	P	-	-	-	AB
	B	アユ・ニジマス 釣獲魚:1 / 保存菌株:3	E	-	P	V	S	-	B

表中のハイフンは A-1 と変異がないことを示す

総合考察

本調査では、天然魚や在来魚からは B 型の冷水病菌のみが検出された。一方で河川病魚から分離されたものはすべて A 型であった。また、解禁前のアユからも A 型が分離されている。感染経路については未解明だが、検出された A 型に変異はほとんどみられなかったことから、なんらかの経路で冷水病発生河川から周囲に広がっているものと推察される。蔓延防止のために、他河川からアユを持ち込まない、使用後の釣り用具は洗浄するなど、可能な範囲での遊漁の際の防疫技術の開発も重要な課題である。

引用文献

- 1) アユ冷水病対策協議会. アユ冷水病対策協議会とりまとめ. 2008: 1-9.
- 2) 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. 淡水魚から分離された冷水病菌の遺伝子型. 長野県水産試験場研究報告 2009; 11: 1-3.
- 3) 谷本剛. アユ冷水病の感染経路の解明と防疫対策. 徳島水研だより 2007; 61.
- 4) 吉浦康寿・釜石隆・中易千早・乙竹充. (2006) Peptidyl- prolylcis-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 2006; 41(2): 67-71.
- 5) 田畑和男. 河川環境中からの PCR 法による冷水病菌検出方法の検討. 兵庫農技総セ研報(水産). 2006; 39: 29-32.
- 6) 武田維倫. PaPV 塩基配列比較試験. 栃木県水産試験場研究報告 2017; 60: 13-14.

(水産研究部)