

河川における冷水病原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* 保菌状況調査および遺伝的型分け

(平成 30 年度)

西村友宏・酒井忠幸・武田維倫・石原 学

目 的

アユの冷水病は *Flavobacterium psychrophilum* (以下, 冷水病菌) を原因とする細菌性疾病であり, アユ漁業に深刻な被害をもたらしている。¹⁾ 主な発症時期は解禁日前後の 6 月から 7 月であるが, 明確な保菌開始時期は明らかでない。そこで感染経路解明のための知見とするため 2016 年,²⁾ および 2017 年³⁾ で, 那珂川天然遡上アユの保菌状況調査を行った。その結果, 2016 年では 4 月 1 日に, 2017 年では 4 月 10 日に陽性が確認されている。そこで本年も同様の調査を行った。

また冷水病菌には, アユに病原性を示す A 型 (A 型), アユに病原性を示さないマス型 (B 型) の存在が知られるように, 多くの遺伝子型の存在が報告されている。^{4,5)} そこで県内河川で優占している遺伝子型を把握するため, 2016 から 2018 年度に単離保存した菌株の遺伝的な型分けを行った。

材料および方法

天然遡上アユ保菌検査 調査は 2018 年 3 月 30 日から 5 月 29 日の那珂川アユ遡上・放流状況調査(p19-20)の際に採捕した天然遡上魚計 218 尾を対象とした。各個体から二次鰓弁の一部組織を摘出後, MightyPrep reagent for DNA (TaKaRa) を用いて total DNA を抽出し, PCR 用のテンプレートとした。PCR はロタマーゼ遺伝子を標的領域とした冷水病菌検出用のプライマーを用いて行った。⁴⁾ PCR には KAPA2G Fast HotStart ReadyMix with dye (KAPA BIOSYSTEMS) を用いた。PCR は各回 2 尾から 6 尾をプールし, 1 ロットとした。病徴のある個体は, 改変サイトファーガ寒天培地を用いた腎臓からの細菌分離を試み, 4°C の培養で出現したコロニーから冷水病菌を単離し, 菌株は -80°C で保存した。

冷水病菌の遺伝的型分け 2016 年から 2018 年の河川の冷水病発症アユから分離した 10 菌株 (表 1) について, 4 種のプライマーセットおよび制限酵素を用いた RFLP 解析を行い, ⁴⁻⁶⁾ それぞれ A/B 型, R/S 型, QR/QS 型, C/D 型に分類した (表 2)。さらに, それらの組み合わせにより 16 型の遺伝的型を決定した。

表 1 2016 年から 2018 年度に分離した冷水菌株の由来および遺伝的型分けの結果

病魚採捕場所	採捕日	遺伝子型	
那珂川水系	那珂川	2018年5月15日	A S QR C型
		2018年5月22日	A S QR C型
		2018年5月29日	A S QR C型
	箒川	2016年6月18日	A S QR C型
鬼怒川水系		2018年6月19日	A S QR C型
	鬼怒川	2017年6月21日	A S QR C型
		2018年6月26日	A S QR C型
思川水系	男鹿川	2018年6月14日	A R QS C型
	大芦川	2018年7月4日	A S QR C型
	黒川	2018年7月4日	A S QR C型

表 2 型分けに使用したプライマーおよび制限酵素

プライマー名	標的領域	制限酵素	遺伝子型	参考文献
FPS-1F FPS-2F	ロタマーゼ	Hinf	A/B型	Izumi et al. 2003 ⁴⁾
PSY-G1F PSY-G1R	トポイソメラーゼ IVBサブユニット	Rsa I	R/S型	Izumi et al. 2003 ⁴⁾
GYRA-FP1F GYRA-FP1R	ジャイレースA サブユニット	Mph1103 I	QR/QS型	Izumi et al. 2007 ⁵⁾
GYR-1 GYR-1R	ジャイレースB サブユニット	Bsp119 I	C/D型	泉ら ⁶⁾

結果および考察

天然遡上アユ保菌検査 5 月 15 日, 22 日, 29 日のサンプルで各 1 尾に病徴 (下顎欠損) が確認され, それぞれ腎臓から冷水病菌が分離された。PCR による保菌検査の結果, 4 月 10 日に 1 ロット, 4 月 24 日に 2 ロット, 5 月 15 日で 1 ロット, 5 月 22 日で 1 ロット, 5 月 29 日で 2 ロットの陽性が確認された (表 3)。

本調査では, 昨年と同日の 4 月 10 日で初めて陽性が確認され, 採捕場所の水温は 16.2°C であった。冷水病は 18°C をピークとして 14°C から 21°C で発生が多いとされ, ¹⁾ 4 月 10 日の水温はその範囲内にあった。

表 3 天然遡上魚の保菌検査結果

採取日	検査尾数 (尾)	平均魚体重 (g)	PCR* (陽性/陰性)	備考
3月30日	2	4.4	0/1	
4月3日	12	4.8	0/2	
4月10日	20	4.7	1/3	
4月17日	64	5.7	0/12	
4月24日	40	5.3	2/6	
5月8日	20	3.6	0/4	
5月15日	20	4.2	1/3	菌株を保存(1株)
5月22日	20	4.8	1/3	菌株を保存(1株)
5月29日	20	5.2	2/2	菌株を保存(1株)

*数字は検査ロット数

冷水病菌の遺伝的型分け 男鹿川で分離された株が A R Q S C 型であったのを除き、他は全て A S Q R C 型に分類された(表 1)。このことから、県内河川では年(2016 から 2018 年) や河川を跨ぎ、A S Q R C 型の冷水病菌が優占していたことが確認された。泉ら⁶⁾の報告でも、アユから分離された冷水病菌株(国内外問わず)では、A S Q R C 型が優占していたとされている。

また、男鹿川の A R Q S C 型が確認されたことから、県内河川において、少なくとものアユ型(A 型)菌株では 2 型が存在していた。

今後、さらにデータを収集し、県内河川における冷水病菌の遺伝子型とその分布を把握することで、感染経路の解明に繋がると考えられる。

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) 石原 学. 河川における冷水病原菌 *Fravobacterium psychrophilum* 保菌状況および塩基配列の比較. 栃木県水産試験場研究報告 2018; 61: 19-20.
- 3) 西村友宏・酒井忠幸・武田維倫. 河川における冷水病原菌 *Fravobacterium psychrophilum* の保菌状況調査および遺伝的型分け. 栃木県水産試験場研究報告 2019; 62: 17.
- 4) Izumi S, Aranishi F, Wakabayashi H. Genotyping of *Fravobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. *Dis. of Aqua. Org.* 2003; 56: 207-214.
- 5) Izumi S, Ouchi S, Kuge T, Arai H, Mito T, Hujii H, Aranishi F and Shimizu A. PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Fravobacterium psychrophilum*. *J. of fish dis.* 2007; 30: 141-147.
- 6) 泉庄太郎・信澤邦宏・久下敏宏・新井肇・鈴木究真. (社)日本水産資源保護協会編 平成 17 年度養殖衛生管理技術開発研究 2006: 37-48.

(水産研究部)