

戦略的プロジェクト研究推進事業（令和元年度／国庫委託）

「アユの異型細胞性鰓病の発病原因の解明と防除法の開発」

—天然水域における PaPV 動態調査—

石川孝典・西村友宏・石原学・森竜也

久保田仁志・和田新平¹・佐野元彦²

目 的

アユ養殖における異型細胞性鰓病（ACGD）は、細菌性冷水病と同様に大きな魚病被害を生じさせている。しかし、発症メカニズムの解明や予防方法の確立には未だに至っていない。そこで、ACGDの主因として疑われるアユボックスウイルス（PaPV）に注目し、天然水域における動態を把握するために県内那珂川の流下したアユ仔魚（流下仔魚）を対象に PaPV の保菌検査を実施した。

材料および方法

調査対象 那珂川新那珂橋（茂木町）付近で11月11日および11月18日に採捕された流下仔魚のうち、それぞれ30尾を調査対象とした。

調査方法 採捕された流下仔魚は99.5%エタノールで固定した。その後、5尾1ロットとして、全魚体から抽出したDNAを鋳型DNAとし、保菌ウイルス量が少ないことが想定され、感度をできる限り上げるためにSemi-nested PCR法によるPaPVの検出を試みた。

DNAの抽出は、市販試薬（MightyPrep reagent for DNA, タカラバイオ）を使用し、マニュアルに従って行った。Semi-nested PCR法の初回PCRは、小松ら¹⁾のPCR用プライマーであるA16L-1FとRのプライマーを使用し、前述の抽出DNAを鋳型DNAとして実施した。2回目のPCRは、前述のA16L-1Rと小松ら¹⁾の定量PCR用のプライマーであるA16L-2Fを組み合わせ、初回のPCR産物をTEバッファーにより50倍希釈したものを鋳型DNAとして行った。PCR反応試薬の組成およびPCR条件の詳細は表1と表2に示した。増幅されたDNA断片の確認は、1%アガロースゲルによる電気泳動により確認した。

表1 PCR反応液の組成

	量(μl)
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix with dye	2.50
Primer-F (10 μM)	0.25
Primer-R (10 μM)	0.25
sUPW	1.50
Template DNA	0.50
合計	5.00

表2 PCR反応の条件

温度(°C)	時間(秒)	サイクル数
95	60	} 40
95	10	
57	10	
72	10	

結果および考察

今回調査対象とした流下仔魚からPaPVは検出されなかった（表3）。和歌山県内の河川で採捕されたアユ仔魚ではPaPVが陰性であるにもかかわらず、その河口付近の海域で採捕された初期稚魚からPaPVの保菌が確認されている。²⁾ また、その海域のマイワシからPaPVの保菌が確認されている。海域に存在するPaPVが何らかの理由により内陸部にある本県に侵入している可能性もあることから、引き続き、天然水域でのPaPVの動態を把握するための調査を実施する必要がある。

表3 保菌検査結果

ロットNo.	使用尾数	採捕日	1st PCR	2nd PCR
1	5	2019年11月11日	N.D.	N.D.
2	5		N.D.	N.D.
3	5		N.D.	N.D.
4	5		N.D.	N.D.
5	5		N.D.	N.D.
6	5		N.D.	N.D.
7	5	2019年11月18日	N.D.	N.D.
8	5		N.D.	N.D.
9	5		N.D.	N.D.
10	5		N.D.	N.D.
11	5		N.D.	N.D.
12	5		N.D.	N.D.

¹ 日本獣医生命科学大学, ² 東京海洋大学

謝辞

試料の流下仔魚をご提供いただいた国土交通省霞ヶ浦導水工事事務所に深謝する。なお、本研究は農林水産省の「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業（国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発）」（JPJ00867. 19190702）により実施した。

引用文献

- 1) 小松大樹・古山朋樹・翠川優希・加藤豪司・石川孝典・西村友宏・久保田仁志・和田新平・佐野元彦.
Plecoglossus altivelis poxvirus 検出のための PCR 法および定量 PCR 法の検討. 令和 2 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集. 2020 : 45. .
- 2) Nakayama H, Uno E, Ashizawa T, Miwa S. PCR-detection of *Plecoglossus altivelis* Poxvirus-like Virus (PaPV) in wild ayu. Fish. Pathol. 2016 ; 51 : 121-124.

(水産研究部)