

水産防疫対策委託事業（水産動物疾病のリスク評価，国際基準・情勢に対応したアクティブサーベイランス等の実施）（令和6年度／国庫委託）－栃木県内におけるアユ冷水病原菌の調査－

石川孝典・高木優也・武田維倫

目 的

アユの冷水病原菌（冷水菌）には，遺伝的に異なる複数のタイプが存在し，アユに対する病害性の強弱などに差異があることが報告されている。¹⁾ このことから，アユの冷水病による被害の軽減を図るには，県内に流行する冷水菌の遺伝的な特徴を把握する必要がある。

本課題では，簡便かつ安価な冷水菌の遺伝子型を判別できる手法であるマルチプレックス PCR 法²⁾により，栃木県内の天然水域および養殖場からの症例で分離された冷水菌の遺伝子型分類を行った。

材料および方法

供試菌株 令和6年に県内で冷水病と疑われた13症例（天然水域12症例，養魚場1症例）（表1，2）および那珂川中流に設置されたやなでの採捕魚（8月から10月，4回，48尾）（表3）を分離対象とした。冷水菌は，トブラマイシン5 μ g/ml含むAOAE平板寒天培地に供試魚の腎臓または患部の一部を白金耳により塗抹，画線することで分離した。寒天培地は，4 $^{\circ}$ Cまたは18 $^{\circ}$ Cで5日から10日程度培養し，生じた黄色のコロニーの一部を検鏡し，長桿菌のみをAOAE平板寒天培地に白金時で画線し，再び18 $^{\circ}$ Cで純粋培養を試みた。なお，複数のコロニーが得られた場合は，1個体の1分離部位につき最大で8コロニーを調査対象とした。

遺伝子分析 解析用の鋳型DNAの抽出は，MightyPrep reagent for DNA（タカラバイオ）により，製品マニュアルに従って行い，16遺伝子の有無を同時に判別できるマルチプレックスPCR³⁾を行った。PCR反応液はMultiplex PCR Assay Kit Ver.2（タカラバイオ）の製品マニュアルに従い調整し，反応スケールは20 μ Lとした。前述の鋳型DNAは1 μ Lとして16組プライマーを用い，各プライマーの終濃度が0.2 μ Mとなるように混合した。

PCR反応は，サーマルサイクラー（T-100，バイオラッド）により，初期変性（94 $^{\circ}$ C，1分間），PCRサイクル（変性（94 $^{\circ}$ C，30秒間），アニーリングおよび伸長（62 $^{\circ}$ C，3分間））を30サイクル，最終伸長（72 $^{\circ}$ C，5分間）を行った。

PCR反応後の産物は，電気泳動槽（Mupid-exU，ミュージピッド）を用いて，TAEバッファー中の2.5%アガロースゲル中で電気泳動（100v,90min）により分離した。DNAバンドの検出は，核酸蛍光染色試薬 GelRed（Biotium）をアガロースゲルに添加し，UVトランスイルミネーターで可視化した。

結果解析 得られたバンドパターンから，遺伝子型を決定した。また，遺伝子型に名称については，バンドパターンをサイズが大きいバンドから16桁の数列に置き換え（バンド有りは1，バンド無しは0），16進数に変換した。²⁾

結果および考察

冷水病が疑われた13症例のうち，天然水域では7症例（20尾），養魚場では1症例（1尾）で，合計40菌株の冷水菌が分離された（表1，2）。

また，やなでの採捕魚は，8月から9月では冷水菌は分離されなかったが，10月17日の採捕魚では，12尾中2尾で冷水病の病徴（下顎の発赤）が認められ，冷水菌も分離された。さらに，10月31日の採捕魚では，冷水病の病徴は観察されなかったが，4尾から合計12菌株の冷水菌が分離された（表3）。

以上の合計52菌株の遺伝子型を解析した結果，CD45型およびCDC5型の2種類の遺伝子型に分けられた（表4）。その内訳は，CD45型が48株，CDC5型が4株で，天然水域や養魚場での症例はすべて前者であった（表1，2，3）。

県内で確認される遺伝子型組成の年変化については，調査年によって対象とした症例数や1個体あたりの分離菌株数等が異なることから単純に比較できないものの，昨年まではCD45型およびCDC5型の両者が流行型として確認されたが，今年はCD45型が主として確認された（図1）。

このように，流行株の変化が生じることから，今後も継続的な流行株の把握が必要であると考えられる。

謝辞

供試魚を提供いただいた（有）あゆの里の小林圭氏，および関係漁協や養殖生産者の皆様に深謝する。なお，本課題の詳細については，令和6年度 水産防疫対策委

託事業（水産動物疾病のリスク評価，国際基準・情勢に対応したアクティブサーベイランス等の実施）により実施した。

型調査，令和元年度 水産防疫対策委託事業 水産動物疾病のリスク評価，国際基準・情勢に対応したアクティブサーベイランス等の実施 施報告書，水産防疫対策委託事業リスク評価共同研究機関，pp.49-57

引用文献

- 1) Nagai T, Tamura T, Iida Y, Yoneji T. Differences in susceptibility to *Flavobacterium psychrophilum* among three stocks of ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Pathol 2004; 39: 159-164.
- 2) 高野倫一・永井崇裕(2020): 冷水病原菌の遺伝子

(水産研究部)

表 1 天然水域における冷水病原菌の分離状況および解析結果

検査 月日	発生 水系	検体 の状態	病徴の 有無	検査 尾数	塗抹部位		培養 温度	分離 尾数	分離 菌株数	抗血清 反応	遺伝子型
					腎臓	患部					
5月19日	C川	冷蔵	無	6	○		18	0	—	—	—
					○		5	0	—	—	—
5月26日	C川	冷凍	有	6	○		18	0	—	—	—
					○		5	0	—	—	—
5月26日	C川	冷凍	有	1	○		18	0	—	—	—
					○		5	1	1	陽性	CD45
5月26日	A川	冷蔵	有	3	○		18	2	2	陽性	CD45
					○		5	2	2	陽性	CD45
						○	5	2	2	陽性	CD45
5月26日	B川	冷凍	有	6	○		18	0	—	—	—
							5	0	—	—	—
6月2日	C川	冷蔵	有	1	○		5	0	—	—	—
6月7日	A川	冷凍	無	1	○		18	0	—	—	—
6月9日	C川	冷蔵	有	3	○		18	2	8	陽性	CD45
6月9日	C川	冷蔵	有	1	○		18	1	8	陽性	CD45
6月14日	A川	冷蔵	有	1	○		18	1	8	陽性	CD45
					○		18	2	1	陽性	CD45
6月24日	A川	冷蔵	有	2	○		5	2	2	陽性	CD45
						○	5	2	2	陽性	CD45
7月17日	C川	冷蔵	有	1	○		18	1	1	陽性	CD45
					○		5	2	2	陽性	CD45

表 2 養魚場における冷水病原菌の分離状況および解析結果

検査 月日	検体 の状態	病徴の 有無	検査 尾数	塗抹 部位	培養 温度	分離 尾数	分離 菌株数	抗血清 反応	遺伝子型
6月25日	冷蔵	有	6	腎臓	18	1	1	陽性	CD45

表 3 やなでの採捕魚の冷水病原菌の分離状況および解析結果

採捕 月日	検査 尾数	陽性 尾数	陽性率 (%)	病徴の 有無	分離 菌株数	抗血清 反応	遺伝子型
8月20日	12	0	0	無	—	—	—
9月19日	12	0	0	無	—	—	—
10月17日	12	2	17	有	8	陽性	CD45
10月31日	12	5	42	無	4	陽性	CDC5

表 4 分離された冷水病原菌の遺伝子型

番号	遺伝子名	PCR産物 サイズ(bp)	遺伝子型名	
			CD45	CDC5
1	DUF262 domain-containing protein	75	+	+
2	hypothetical protein EYV94_24770	98	-	-
3	hypothetical protein	124	+	+
4	DndC	150	-	-
5	DEAD/DEAH box helicase	183	-	-
6	hypothetical protein FPN185_contig00011-0042	216	-	-
7	hypothetical protein	257	+	+
8	superoxide dismutase	280	-	+
9	DUF692 family protein	332	+	+
10	hypothetical protein	389	-	-
11	DUF3164 family protein	430	+	+
12	class D beta-lactamase	475	+	+
13	DUF262 domain-containing protein	517	-	-
14	DUF4393 domain-containing protein	592	-	-
15	oligosaccharide repeat unit polymerase	666	+	+
16	N-6 DNA methylase	748	+	+

+ : 陽性 - : 陰性

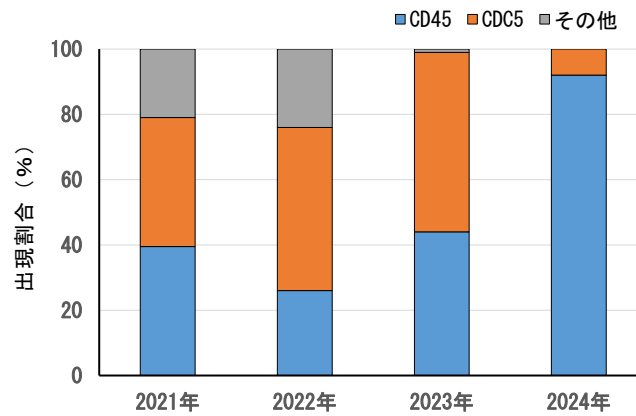


図 1 分離菌株の遺伝子型出現割合の経年変化