

(5) 河川における人工種苗放流後の細菌性冷水病原因菌の動態把握

中城 岳・隅川 和

(1) 目的

アユの主要疾病である細菌性冷水病（以下、冷水病）の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum*（以下、*F. psychrophilum*）は、過去の研究によって河川に周年定着している可能性が高いと考えられている。そのため、冷水病への感染経験のない人工種苗を放流した場合、環境水中の冷水病菌に感染し、大量へい死が発生する恐れがある。

こうした懸念を明らかにするため、人工種苗放流後の河川水中の環境 DNA を分析し、*F. psychrophilum* が人工種苗放流を起因として河川内で増殖するか調査した。

(2) 材料と方法

本調査は津野町の四万十川水系北川川で実施した。なお、本河川の下流側には津賀ダムが存在しているため、本河川への天然アユの遡上は不可能である。調査地点は本河川の芳生野から大野地までの約 22km の区間のうち、調査点①（郷内大橋）、②（役場前）、③（新大古味橋）の計 3 地点とした（図 1）。令和 5 年 5 月 25 日（本県産人工種苗放流後 29 日経過）及び 6 月 29 日（本県産人工種苗放流後 36 日経過）の計 2 日、各地点で河川水 1L を 2 本ずつ採取した。採取した河川水サンプルは当センターまで冷蔵状態（約 4℃）で持ち帰り、-20℃で 24 時間以上凍結保存した。河川水サンプルは解凍後、全量を孔径 0.1mm の GF/F ガラスフィルター（Cytiva）及び孔径 0.2µm のサイクロポアメンブレンフィルター（Cytiva）でろ過し、これらのフィルターから嶋原ら（2015）に従い DNA を抽出し、今城ら（2017）が設計した TaqMan 蛍光プローブを用いたリアルタイム PCR（以下、qPCR）法に供し、冷水病菌に特異的な PPIC 遺伝子のコピー数を算出した。なお、2 サンプル分の平均コピー数を各調査点のコピー数とした。また、qPCR 反応液の組成は、テンプレート DNA 2.0µL、Probe qPCR Mix（タカラバイオ）5.0µL、フォワード及びリバースプライマー各 0.25µL（最終濃度各 0.25µM）、プローブ 0.2µL（最終濃度 0.2µM）を混合し、超純水で最終液量 10.0µL に調整した。qPCR 反応は Light Cycler 96（Roche）を用い、初期熱変性を 95℃30 秒、続いて 2 ステップサイクル（95℃5 秒、60℃30 秒）を 50 サイクル行った。

(3) 結果と考察

調査地点における PPIC 遺伝子のコピー数の推移は図 2 の通りであった。調査点①のみ、わずかにコピー数の増加が見られたが、調査点②は僅かに減少し、調査点③は横ばいであった。3 地点の平均コピー数は、5 月 25 日が 9.73×10^1 copies/L、6 月 29 日が 1.73×10^2 copies/L であり、ほぼ横ばい傾向であった。

以上の結果より、人工種苗放流後の一定期間経過後においても、河川内での *F. psychrophilum* の顕著な増殖はなかったと考えられた。ただし、大雨による増水や濁水の発生など、河川環境の急変によって、アユに大きなストレスがかかった場合、免疫力の低下によって、冷水病を含む疾病への感染及び発症の危険性が高まる可能性が考えられる。



図1 四万十川水系北川川における調査区間及び調査点

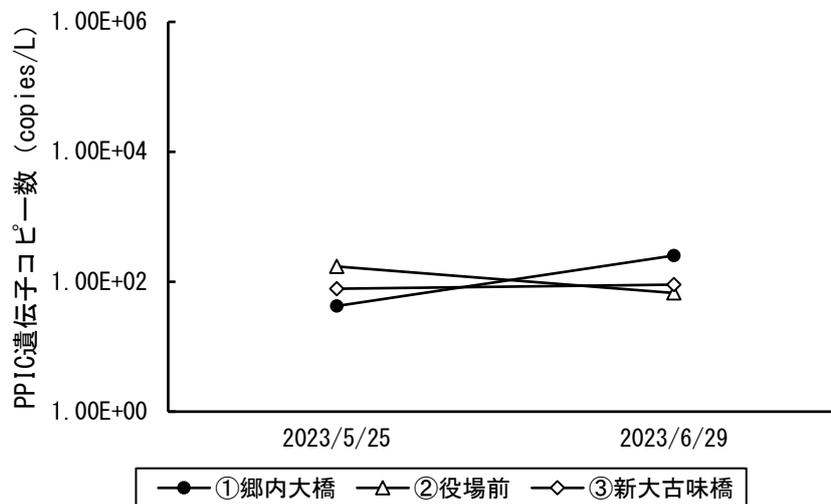


図2 各地点におけるPPIC遺伝子のコピー数の推移

【引用文献】

今城雅之・山崎憲一・山下はづき・門野真弥・片岡榮彦・大崎靖夫・高橋 徹 (2017) 高知県鏡川におけるアユ細菌性冷水病の疫学調査. 魚病研究, 52, 141-151

嶋原佳子、河東康彦、柳宗悦、前野幸二、釜石隆 (2015) 養殖場における *Nocardia seriolae* の分布に関する研究. 平成 27 年度日本魚病学会春季大会.