

5 河川における人工種苗放流前後の細菌性冷水病原因菌の動態把握

中城 岳・石川 徹・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* 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、大量斃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、人工種苗放流前後の河川水をサンプリングし、環境 DNA を分析することにより、冷水病菌が人工種苗放流を起因として河川内で増殖するか否かを調べた。

(2) 材料と方法

令和 4 年 3 月 23 日（放流前）、4 月 27 日（本県産人工種苗放流後 19 日経過）及び 5 月 25 日（他県産人工種苗放流後 12 日経過）の計 3 日、四万十川水系北川川の芳生野から大野地までの 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 地点を調査定点とし（図 1）、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。放流前の 3 月 23 日から全 3 地点で PPIC 遺伝子が検出され、3 地点の平均コピー数は 3.4×10^2 copies/L であった。また、放流後の 4 月 27 日及び 5 月 25 日も同様に PPIC 遺伝子が検出されたが、平均コピー数はそれぞれ 3.0×10^2 copies/L 及び 3.5×10^2 copies/L であり、増減は見られなかった。

以上の結果より、人工種苗の放流直後には、河川内で冷水病菌は増殖していないことが分かった。ただし、河川水温と飼育水温が大きく異なる地点への放流などによって、放流種苗に大きなストレスがかかった場合、アユ自体の免疫力が低下することで、冷水病を含む疾病への感染及び発症の危険性が高まるため、放流場所や放流方法を事前に十分検討する必要があると考えられる。

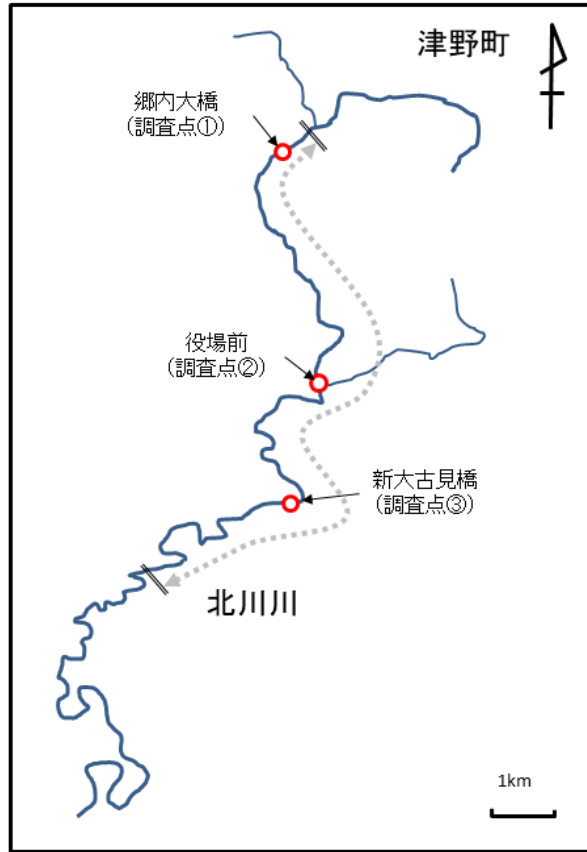


図1 四万十川水系北川川における調査区間及び調査点

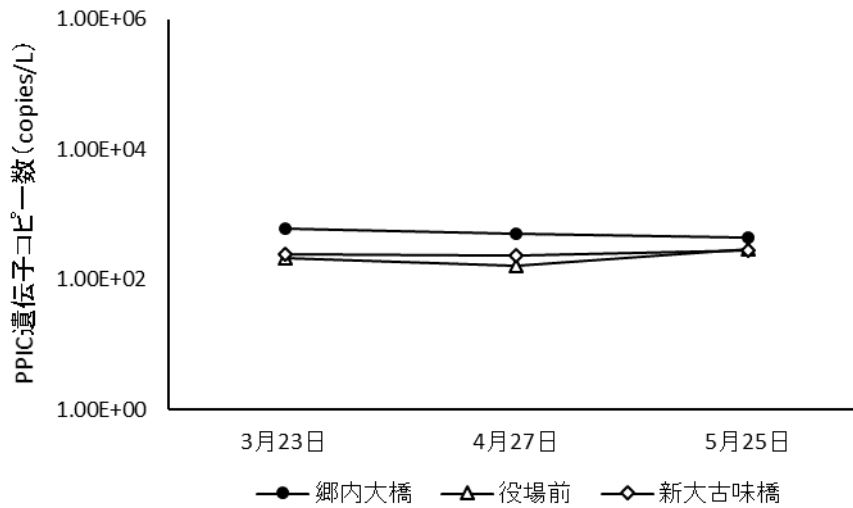


図2 各地点におけるPPIC遺伝子のコピー数の推移

【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.