

10) アユの冷水病原因菌保菌検査手法の検討

山本充孝・二宮浩司

【目的】冷水病の防疫体制を確立するために検出感度が高く、かつ簡便な保菌検査手法が望まれている。最近、これまでの培養法による検査に加え、PCR 法による保菌検査手法が開発されている。そこで、現在実施されている寒天平板を用いた培養法と PCR 法によるアユの冷水病原因菌(*Flavobacterium psychrophilum*)の検出率の比較を行った。

【方法】

- ①供試魚:平均体重 3g の冷水病自然発症アユを発病後無処理で飼育した。検出率の比較に用いたアユは、基本的に培養法と PCR 法と同一個体を用いた。
- ②培養法:試料は腎臓と鰓とし、それぞれ改変サイトファーガ培地に塗抹し、腎臓は 15℃、鰓は雑菌の繁殖を抑えるため 5℃で培養した。また、冷水病原因菌の確認は、抗冷水病菌血清を用いたスライド凝集反応で行った。
- ③PCR 法:腎臓と鰓をそれぞれ 10mg 採取し、PSB(-)を加えホモジナイズしたものをサンプルとした。そのサンプルから温度処置により DNA を抽出した後、DNA 増幅を Nested PCR により行った。PCR 産物は、ゲル電気泳動により目的 DNA 断片を分離して増幅を確認した。

【結果】

冷水病菌の検出は、発病前には、培養法では、鰓;41/95 (陽性検体数/検査検体数)、腎臓; 20/95 となり、PCR 法では、鰓; 31/90、腎臓; 10/90 となり、培養法の方が検出率が高かった。(表 1、2)

個体毎に検出を評価した場合、PCR 法で陰性となり、培養法で陽性となった検体は、発病中、終息後あわせて 33/190 検体となり、逆に培養法で陰性となり、PCR 法で陽性となった検体は、13/180 検体あった。(表 2)

今回の試験結果から培養法と PCR 法の検出率を比較すると、鰓・腎臓とも、培養法が高くなり、PCR 法により検出率が向上することはなかった。しかし、その検出においては、培養法のみ陽性となる場合、PCR 法のみ陽性となる場合があり、一概に検出率の優劣をつけることはできなかった。

この原因として、培養法においては、鰓からの検出の際、雑菌やカビの繁殖により、陽性と判定できていない可能性がある。また、PCR 法においては、ホモジナイズし、PCR にかけるサンプル量が少量であるため、DNA 増幅を行う際、既にサンプル中に冷水病原因菌が存在していない可能性が考えられる。

【留意点】

両検査手法の特徴としては、培養法には、①コスト面では安価②操作面では、より簡便といった長所があり、PCR 法には、①凍結によりサンプルの長期保存が可能②培養法と異なり、鰓からの検出の際、雑菌やカビの繁殖による影響を受けないといった長所がある。これらを考慮した場合、冷水病菌の検査手法として、それぞれ特色があるため、状況に応じて 2 つの手法を使い分けて検査を行っていく必要があるものと思われた。

今後、検出法の改良にあたって、培養法については、雑菌等の影響を受けにくい鰓からの培養方法の検討、PCR 法については、DNA 抽出以前の菌の動態把握が必要である。

表 1. アユの冷水病菌保菌検査結果 (陽性数/検査数)

	培養法		PCR 法	
	鰓	腎臓	鰓	腎臓
発病前	0/30	0/30	0/25	0/25
発病中	25/35	14/35	20/35	6/35
終息後	16/30	6/30	11/30	4/30
計	41/95	20/95	31/90	10/90

表 2. アユの冷水病菌保菌検査陽性率 (%)

	培養法		PCR 法	
	鰓 (%)	腎臓 (%)	鰓 (%)	腎臓 (%)
発病前	0	0	0	0
発病中	71	40	57	17
終息後	53	20	37	13
計	43	21	34	11

表 3. 培養法と PCR 法による保菌検査結果の相違

	培養法のみ陽性		PCR 法のみ陽性		不一致率(%)	
	鰓	腎臓	鰓	腎臓	鰓	腎臓
発病前	0/30	0/30	0/25	0/25	0	0
発病中	11/35	10/35	6/35	2/35	24	17
終息後	8/30	4/30	4/30	1/30	20	8
計	19/95	14/95	10/90	3/90	17	7

不一致率:検査数に占める培養法のみ陽性の数と PCR 法のみ陽性の数を足した割合

(培養法のみ陽性数/培養法検査検体数+PCR 法のみ陽性数/PCR 検査検体数) × 100