

30) PCR法による天然アユの冷水病菌保菌状況調査について

山本充孝・二宮浩司・遠藤誠（水産課）

【目的】琵琶湖および琵琶湖流入河川等の天然水域における漁獲時期および生息場所毎のアユ冷水病菌の保菌実態を把握するために行った。

【方法】供試魚：1999～2003年に琵琶湖および河川で採捕されたアユを用いた。すなわち、エリ、ヤナ、沖すくい網、刺網および追さで網によって漁獲されたもの、アユ漁が行われない8～11月中旬はヒウオ曳および電気ショッカーで採集した計101ロット、5790尾(以前の結果を含む)を用いた。なお、供試魚は使用するまで-105℃で保管した。

保菌検査：①前処理アユは左第1鰓弓を採取し、1.5mlチューブに入れPBS(-)を1ml加えて30秒激しく攪拌した後、鰓を取り除き、残った鰓表面洗浄液を10000G、4℃で20分遠心分離した。その上清を廃棄し沈渣を50 μ lのPBS(-)に再懸濁して鰓洗浄サンプルとした。②DNA抽出鰓洗浄サンプルおよび腎臓ホモジネート10 μ lに5%Chelex100溶液を300 μ l加え、55℃で30分インキュベートし、10秒激しく攪拌後、さらに100℃で20分インキュベートし10000G、4℃で20分遠心分離した上清をPCRテンプレートとした。③PCR条件PCRはnested PCRで行った。反応液の組成はTaq DNAポリメラーゼ(5U/ μ l)0.05 μ l、10 \times buffer1 μ l、dNTPmixture0.8 μ l、プライマーペア各1 μ l、テンプレート2 μ l、滅菌蒸留水4.15 μ lの計10 μ lとした。プライマーには1st PCRには20F、1500Rを2nd PCRにはPSY1、PSY2を用いた。PCR反応条件はプレヒーティング94℃、5分、熱変性94℃、30秒、アニーリング51℃、90秒、伸張72℃、2分を30サイクル、さらに最終サイクル72℃、5分とした。なお、2nd PCRのテンプレートには1st PCR産物をTEバッファーで5%に希釈して用いた。2nd PCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウム染色して目的DNA断片の増幅を確認した。

【結果および考察】

検査部位は昨年までの調査により、ほぼすべてのロットで腎臓よりも鰓において陽性率が高いことから鰓のみを用いて検査した。アユ冷水病菌保菌検査結果を表1. および図1. に、検査ロット数を表2. に示した。保菌率は月別では10～3月までは低いが、4月に上昇する傾向が認められた。保菌率が最も高いのは6～7月で8～9月には保菌率が低下する傾向が認められた。これは冷水病菌が23℃以上では増殖できず、7月下旬頃には琵琶湖岸および河川水温がこの温度付近まで上昇するためと思われた。

ロット毎の保菌率の変動(バラツキ)は保菌率が高くなる4～7月のエリおよびヤナで特に顕著であり、漁獲された年毎に比較しても一定の傾向はなく、ロット毎に大きく異なると考えられた。前回は漁獲場所によって保菌率を比較すると琵琶湖沖が最も低く、琵琶湖岸および河川で高い傾向が認められ、保菌率は沖合で生活している間は低く、接岸等で集群するとき水平伝播によって高まるのではないかとと思われると報告したが、湖岸付近の中でもエリで漁獲されるアユの保菌率が高かった。このエリが高い理由として考えられることは漁法の性格上、エリつぼに入ってから時間が1日程度あることからその間に感染が広まるために、同時期の琵琶湖岸付近で行われる刺網および追さで網と比較して保菌率が高くなることが考えられる。

表1. 1999～2003年に漁獲されたアユにおける冷水病菌保菌検査結果(%) 検査部位: 鰓

採集方法	11月	12月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	総計
エリ	0.0	3.3	1.0	8.3	30.8	26.7	70.0	59.7				30.5
変動幅(%)	0~0 0~5.0 0~3.0 0~20.0 0~63.3 6.7~73.3 23.3~96.7 35.0~91.7											
刺網(小糸)			0.0	5.0		6.7	26.7	10.0				19.2
変動幅(%)	0~0 5.0~5.0 0~13.3 26.7~26.7 10.0~10.0											
沖すくい網							12.0	6.3	0.0			8.5
変動幅(%)	0~26.7 0~15.0 0~0											
ヒウオ曳(小型引き網調査)	4.7										2.5	3.4
変動幅(%)	0~13.3 0~11.7 0~13.3											
追さで網					5.0	0.0						2.5
変動幅(%)	5.0~5.0 0~0 0~5.0											
ヤナ			0.0	6.5	32.1	55.0	56.7	51.9				47.1
変動幅(%)	0~0 6.5~6.5 10.0~58.3 0~91.7 8.3~96.7 1.7~100											
ショッカー(河川のみ)									11.3	11.9	2.8	10.7
変動幅(%)	2.3~24.5 0~55.0 2.8~2.8 0~55.0											
全漁法計	2.3	3.3	0.6	7.9	32.2	34.6	47.6	41.0	9.0	11.9	2.6	26.1
変動幅(%)	0~13.3 3.0~5.0 3.0~20.0 0~65.0 0~91.7 0~96.7 0~100 0~24.5 0~55.0 0~11.7 0~26.7											

表2. 1999～2003年に漁獲されたアユにおける冷水病菌保菌検査ロット数

採集方法	11月	12月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	総計
エリ	5	3	3	4	4	4	6	5				32
刺網(小糸)			1	1		2	1	1				6
沖すくい網							5	4	1			10
ヒウオ曳(小型引き網調査)	5										7	12
追さで網					1	1						2
ヤナ			1	1	4	6	7	7				26
ショッカー(河川のみ)									4	5	1	10
全漁法計	10	3	5	4	10	12	19	17	5	5	8	98

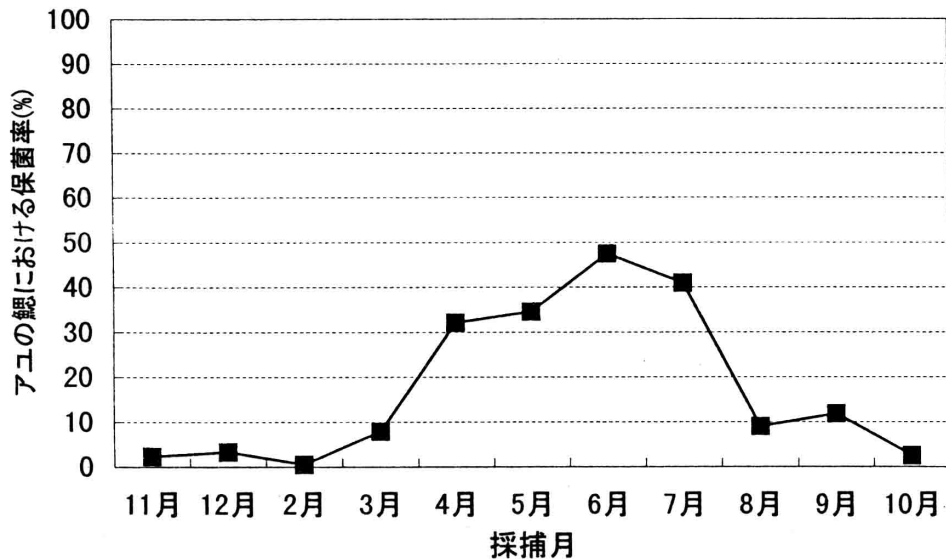


図1. 琵琶湖および流入河川において漁獲されたアユにおける冷水病菌保菌率(%)の月別変化