

4 7) 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

【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：2000～2002 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、沖すくい網および追さで網によって漁獲された 1676 尾および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 1072 尾の計 2748 尾を用いた。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。また、解剖して腎臓を 10 μ g 採取し、200 μ l の STE でホモジナイズして腎臓ホモジネートとした。なお、腎臓を 10 μ g 採取できない小型個体は鰓だけを検査した。**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。

保菌状況の解析：保菌率はすべてカテゴリー毎に平均値で示した。また、漁法別の結果は漁獲された場所から沖すくい網、ヒウオ曳で採捕したものを琵琶湖沖、エリ、追さで網を琵琶湖岸、ヤナ、電気ショッカーを河川として 3 つに分類し、漁獲場所による保菌率の違いを表した。

【結果および考察】 採捕月別のアユ冷水病菌保菌検査結果を表 1 に示した。冷水病菌の鰓と腎臓の保菌率は両方を検査した 35 ロット中、12 月と 4 月に採捕された 2 ロットを除いて鰓が腎臓と同じか上回り、鰓でより多くの個体が保菌していた。月別結果は鰓において 10～3 月までは低いが、4 月に上昇する傾向が認められた。5 月には保菌率が低下する傾向を示し、6 月に再び上昇した。また、11～7 月と長期間漁獲が行われるエリ漁における結果では全漁法の結果とは異なり、4 月で低いものの、6 月には高くなる傾向を示した (図 1)。これらの 4～6 月保菌率の変動は、この期間のロットによる保菌率の変動がエリでは 0～90.0%、ヤナでは 0～73.3%と大きく、同時期に同漁法で採捕しても魚群によって保菌率が異なるためと思われる。そのため、今後さらに数多くのロットで検査する必要があると思われる。また、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る。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た(表 2)。また、この傾向は漁獲時期を 6～7 月に限定するとさらに顕著であった(表 3)。これらのことから、アユの保菌率は沖合で生活している間は低く、接岸等で集群してその群の密度が一定レベルを超え、水平伝播が容易となり、尚かつ一部の保菌または発病したアユから排菌されることによって非保菌アユが保菌して高まるのではないかと思われる。また、4～6 月に魚群によって保菌率のバラツキが大きいことはこの 2 つの条件が揃った群では高くなり、揃わない群では低いと考えられる。この 2 つの条件はアユが集群して高密度で生活する期間が長い場合に起こりやすいと考えられる。また、遡上時期にはアユが生活形態を変える時期でもあり、その際にアユに生理的変化等が起こることが保菌率の上昇を誘発することや、冷水病菌の増殖速度は 18℃で最大となることから天然水域の水温が上昇してくることで、増殖適温となることも一因と考えられる。

表1. アユ冷水病菌保菌検査結果(月別)

採集月	鰓			腎臓		
	陽性数	検査数	保菌率(%)	陽性数	検査数	保菌率(%)
10	11	416	2.6	0	36	0.0
11	13	379	3.4	—	—	—
12	3	120	2.5	6	80	7.5
1	—	—	—	—	—	—
2	0	105	0.0	0	105	0.0
3	4	186	2.2	2	126	1.6
4	65	250	26.0	57	250	22.8
5	2	210	1.0	1	210	0.5
6	132	385	34.3	23	385	6.0
7	86	280	30.7	22	280	7.9
8	24	213	11.3	8	213	3.8
9	35	204	17.2	20	204	9.8
計	348	2748	12.7	133	1773	7.5

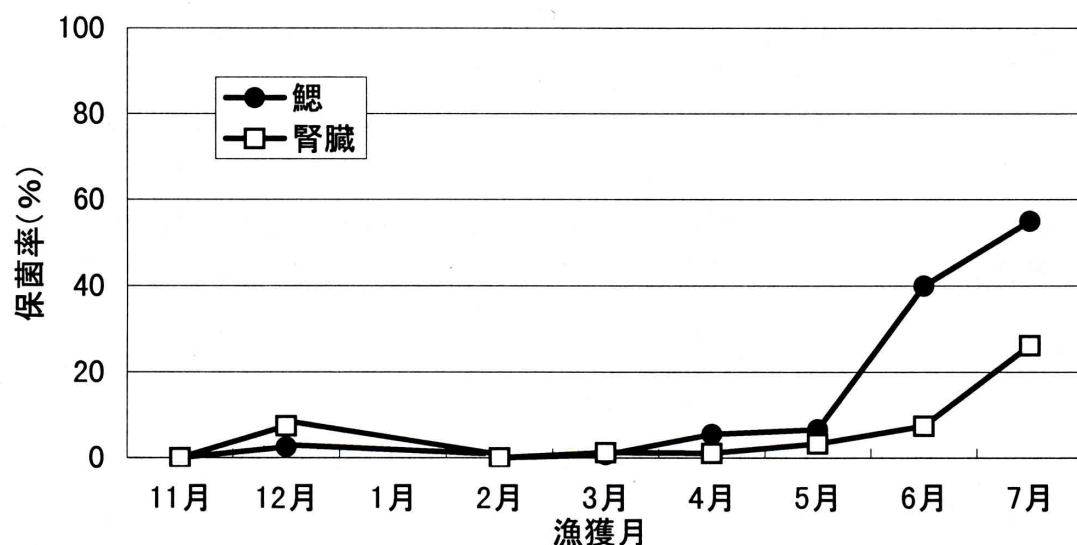


図1. エリ漁獲アユにおける保菌率の変化.

表2. アユの漁獲場所別の冷水病菌保菌検査結果

区分	鰓			腎臓		
	琵琶湖沖	琵琶湖岸	河川	琵琶湖沖	琵琶湖岸	河川
陽性数	26	88	261	0	36	103
検査数	739	820	1189	120	580	1189
保菌率(%)	3.5	10.7	22.0	0.0	6.2	8.7

表3. 6～7月に漁獲されたアユの漁獲場所別の冷水病菌保菌検査結果

	鰓			腎臓		
	琵琶湖沖	琵琶湖岸	河川	琵琶湖沖	琵琶湖岸	河川
陽性数	3	76	139	0	27	18
検査数	120	160	385	120	160	385
保菌率(%)	2.5	47.5	36.1	0.0	16.9	4.7