

- 1 課題名 アユ資源復元（冷水病対策技術開発）
- 2 区分 県単
- 3 期間 平成20年度～21年度
- 4 担当 内水面試験地
(藤井久之・高橋芳明・原田慈雄)

5 目的

河川におけるアユ冷水病の被害を軽減する有効な対策を確立するための知見を得る。

6 成果の要約

(1) 試験方法

ア 県内河川で放流される主なアユ種苗の冷水病耐性
本県海産（以下A），本県海産由来人工F2（以下B），他県耐病性人工（以下C），他県湖産由来人工F2（以下D）の4系統の種苗を用い、人為感染により耐病性を比較した。試験は室内FRP水槽又は屋外コンクリート水槽を用いて行い、各系統を別々の水槽に收容する分離飼育及び同一の水槽に收容する混合飼育により累積死亡率を比較した。FRP水槽による感染試験は、分離飼育は各系統を30尾ずつ別々のFRP水槽(約130L)に、混合飼育は各系統を15尾ずつ同一のFRP水槽(約

400L)に收容して行なった。コンクリート水槽による感染試験は、分離飼育は各系統を200尾ずつ別々のコンクリート水槽(約2t)に、混合飼育は各系統を50尾ずつ同一のコンクリート水槽(約2t)に收容して行なった。人為感染は、冷水病によるへい死魚を收容した水槽からの排水を試験水槽に添加又はへい死魚を直接試験水槽に收容して行なった。

イ 河川環境中からの冷水病菌の高感度検出方法について

検出方法はppiC領域とgyrB領域を対象としたnested PCR法とし、両領域で陽性であったものを陽性と判定した。この方法をもとに、試料から直接DNAを抽出する方法と試料を液体MCY培地に添加し増菌培養し遠心分離産物からDNAを抽出する方法で、特異性・感度の変化を検討した。すなわち、7個のバケツ(13L容)に河川伏流水を10L入れ、10段階希釈により6段階の濃度に冷水病菌を添加した菌液($4.4 \times 10^6 \sim 4.4 \text{CFU/ml}$)を作成し、1個は菌を加えず河川伏流水のみの対照区とした。これらにあらかじめ藻類を付着させた10cm²のタイルを30分間浸漬し、ハブラシで藻類

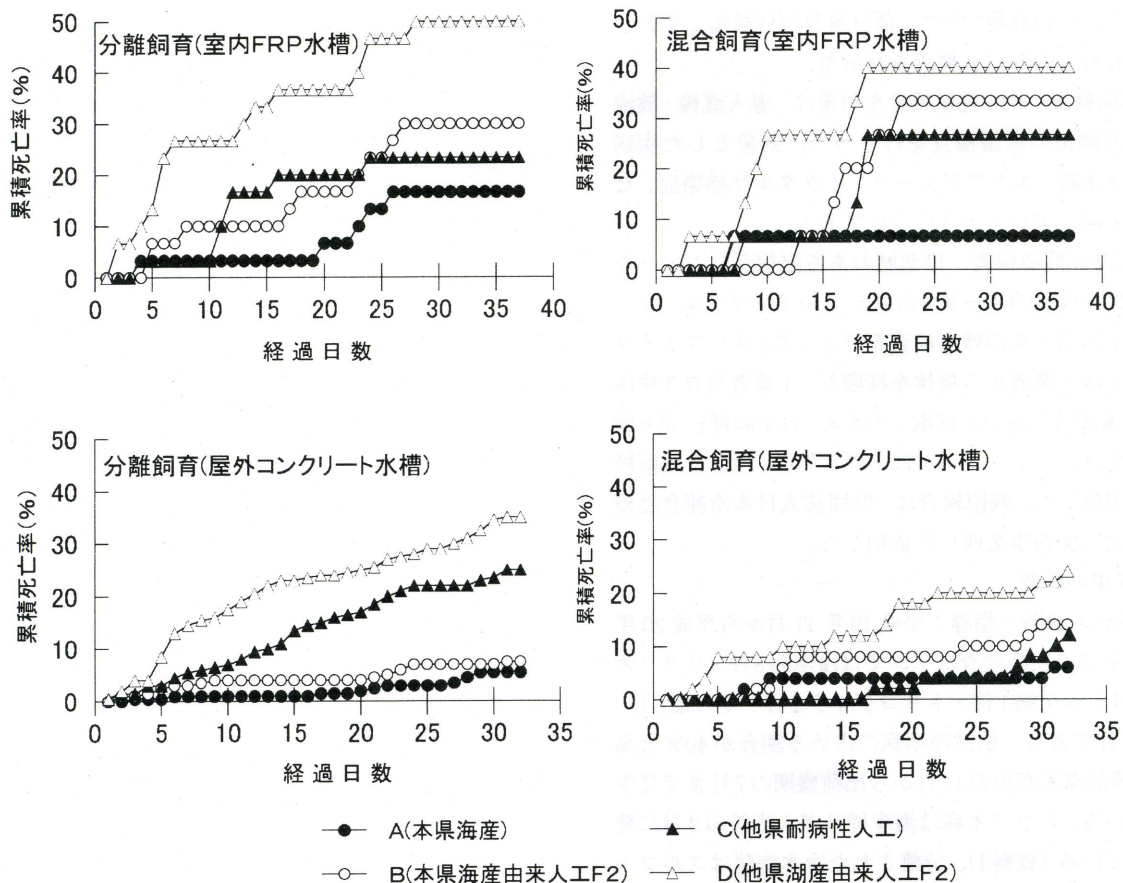


図1 感染試験による死亡率の推移

内水面試験地

をはぎ落として試料とし、前述の2方法でDNAを抽出し、どの希釈段階まで検出できるか、また対照区で陰性となるか検討した。

(2) 成果の概要

ア 県内河川で放流される主なアユ種苗の冷水病耐性
室内FRP水槽による感染試験では、死亡率は分離飼育、混合飼育ともD>B>C>Aであり、有意差がみられたのはAを基準とした場合Dのみであり、B、Cとはみられなかった(図1)。屋外コンクリート水槽による感染試験では、死亡率は分離飼育ではD>C>B>A、混合飼育ではD>B>C>Aであり、有意差がみられたのはAを基準とした場合Dのみで、B、Cとはみられなかった(図2)。へい死魚からは冷水病菌が分離され、へい死原因は冷水病であると判断された。以上より、冷水病に最も強いのは海産、次いで海産由来人工又は他県産耐病性人工であり、湖産由来人工は

最も冷水病に弱いと考えられる。

イ 河川環境中からの冷水病菌の高感度検出方法について

試料から直接DNAを抽出した場合、ppiC領域は対照区でも陽性、すなわち擬陽性となり、gyrB領域は 4.4×10^5 CFU/mlの濃度までしか検出できなかった。しかし、試料を増菌培養後、菌を濃縮した場合、ppiC領域、gyrB領域とも4.4CFU/mlの濃度まで検出でき、また対照区では陽性となることはなく、感度・特異性とも大幅に向上することが明らかになった(表1)。

7 成果の取り扱い

(1) 成果の普及

平成20年度県下河川等組合長連絡協議会で成果の一部を報告した。

(2) 成果の発表

特になし

表1 ppiC領域及びgyrB領域を標的としたnested PCR法のテンプレートの作成方法の違いによる特異性・感度の比較

菌濃度 (CFU/ml)	試料から直接DNA抽出した場合		試料を増菌培養・濃縮後DNA抽出した場合	
	ppiC	gyrB	ppiC	gyrB
4.4×10^5	+	+	+	+
4.4×10^4	+	-	+	+
4.4×10^3	+	-	+	+
4.4×10^2	+	-	+	+
4.4×10^1	+	-	+	+
4.4	-	-	+	+
0	+	-	-	-

* +:陽性 -:陰性