

アユ冷水病防疫に関する指針

平成16年3月
(平成20年3月改訂)
アユ冷水病対策協議会

農林水産省

はじめに

アユ冷水病については、平成6年度から9年度まで水産庁の指導により関係県によるアユの冷水病関係地域合同検討会を、平成10年度から12年度まで関係都府県の研究機関、全国内水面漁業協同組合連合会等を構成員とするアユ冷水病対策研究会を、平成13年度からは都道府県の関係部局、全国内水面漁業協同組合連合会等を構成員とするアユ冷水病対策協議会を開催し、アユ冷水病に関する共同研究及び蔓延防止対策を実施してきた。

その成果の一環として、平成13年3月にアユ冷水病対策研究会として、「アユ冷水病防疫に関する申し合わせ事項」等を取りまとめた。

今般、アユ冷水病対策協議会においては、これまで得られた知見等を踏まえて、都道府県等がアユ冷水病対策を講じる上での統一的な資料として「アユ冷水病防疫に関する指針」を作成した。

アユ冷水病対策のためには、アユ種苗生産者、中間育成者、仕立て関係者、大型養成者、蓄養者、輸送関係者、放流者、釣り人、オトリ販売者等の関係者がどのようなことに留意すべきか十分理解し、取り組む必要がある。

このため、各都道府県等においては、この「アユ冷水病防疫に関する指針」と併せ、別途作成した「アユ冷水病対策のポイント（パンフレット）」を活用し、関係者へのアユ冷水病対策のための基本的事項の普及・啓発を図り、アユ冷水病の発生予防及び発生時の適切な対応に努められるようお願いする。

平成16年3月
アユ冷水病対策協議会

改訂に当たって

アユ冷水病対策については、平成16年度以降もアユ冷水病対策協議会を継続することとされ、平成16年3月に作成された「アユ冷水病防疫に関する指針」及び「アユ冷水病対策のポイント（パンフレット）」等の活用により関係者へのアユ冷水病対策のための普及・啓発を図るとともに、アユ冷水病に関する共同研究を行ってきた。

この間、アユ冷水病に関する新たな知見が得られるとともに、診断方法の改良等が図られたことから、今般、本指針を改訂することとした。

引き続き、各都道府県及び関係者の協力によりアユ冷水病の発生予防及び発生時の適切な対応に努められるようお願いする。

平成20年3月
アユ冷水病対策協議会

I. アユの冷水病を防ぐために

1. アユの冷水病とは

(冷水病の特徴)

- ・グラム陰性長桿菌のフラボバクテリウム・サイクロフィラムが原因の細菌感染症。
- ・主な症状は鰓や内臓の貧血で、体側や尾部に潰瘍症状（いわゆる穴あき）を示すものも多い。このほか、下あごに出血や潰瘍症状を示したり、筋肉や腹腔内に出血を起こしているものも見られる。
- ・冷水病菌は魚の状態を悪くすると発病しやすく、再発もするので、飼育中はもちろん、輸送・放流時においても極力、魚にストレスを与えないことが重要である。

2. 基本的事項

(1) 基本的な考え方

- 1) 養殖場や天然の河川・湖沼への冷水病の拡散を防止することを基本理念とする。
- 2) 移動・放流種苗の具備すべき条件として、病原菌を保有していないことを原則とする。

(2) 移動・放流可否の判断基準

- 1) 移動・放流直前に冷水病と疑われる症状もなく、継続した死亡が見られない飼育群については当面、移動・放流を可とする。
- 2) 移動・放流直前に継続した死亡があるか、あるいはアユ冷水病の発生、または冷水病が疑われる症状が一部の個体で認められる飼育群については、以下の対応を現場に指導する。
 - ①一時、移動・放流を延期する。
 - ②魚病診断機関に診断を依頼する。
 - ③診断結果が冷水病、または他の疾病となった場合、移動・放流を一旦中止し、効能が承認された水産用医薬品による治療や加温処理等により、病状の回復を図る。
 - ④治療後は一定期間飼育した後に保菌検査を行い、陰性を確認してから放流を可とする。

(3) アユ冷水病診断及び保菌検査手法

- 1) アユ冷水病の診断は資料1及び資料2に記載された方法によって行う。保菌検査は診断法に準じて行う。
- 2) 1飼育群の保菌検査個体数は60個体とする。PCR法により行う場合は、複数個体をプールして1検体とし6検体以上を、また、培養法により行う場合には60個体を

検査する。

Ⅱ．防疫のための具体的措置

種苗飼育施設及び管理・輸送・放流に対して、以下の措置の普及を図る。

1．種苗の飼育管理等に関する疾病防除対策（種苗供給施設・養殖場等）

（1）適正な飼育環境の確保

1）飼育施設は使用前に消毒を実施し、飼育施設や器具類は清浄な状態を保つ。

また、飼育担当者以外の不必要な立ち入りを規制し、かつ、手やゴム手袋、長靴、合羽、水槽、器具等の消毒を徹底する。

2）飼育器具類（タモ網、ブラシ）は池ごとに専用とし、複数の池との混用は避ける。

3）可能な限り飼育密度を低くする。また、残餌及び糞等をこまめに除去する

4）常に飼育池を観察し、こまめに衰弱した魚や瀕死魚、死亡魚は速やかに取り除き、焼却等により処分する。継続したへい死があつて冷水病の発生が疑われる池の魚は移動させず、速やかに診断を受ける。

5）用水は地下水を使用することが望ましい。河川水を使用する場合は、濾過した上で紫外線で殺菌処理を施すことが望ましい。能力が十分であれば循環濾過で飼育しても良いが、飼育槽への流入口に紫外線等による殺菌装置を設置した方が良い。また、排水路では、種苗の選別や蓄養を行わない。

6）飼育水の急激な温度変化を避ける。

7）飼育池の排水部（河川水を使用の場合は注水部も）にはスクリーン等を設置して、保菌あるいは汚染の可能性のある生物の侵入を防ぐ。また、水車等の水しぶきが他の池に飛ばないようにする。

8）施設・器具類の消毒に関する措置

①原則として通常使用されている手法及び消毒剤（逆性石鹼、アルコール類、塩素系消毒剤等）を使用する。

②消毒剤の病原菌への作用機序や特性を理解し、水産生物や人体、環境に及ぼす影響を避けることを念頭に置き、薬剤の選定や消毒作業を行う。

③消毒剤はその都度調整し、用法、用量を厳守し、過度な使用を避ける。

④使用後の消毒剤の廃棄は環境に配慮し、分解あるいは中和が必要な薬剤については、その薬剤に添付されている使用上の注意等に従い、適切に処理して廃棄する。

[補足説明]

・冷水病菌は目で見えないので、確実に消毒されたもの以外は全て、冷水病菌が付いていると思つて作業することが必要である。

・特に人体、衣服、長靴、器具、タモ、鳥などは冷水病菌が付いているものとして扱う。

・消毒には以下の消毒剤を使うと良い。

手、ゴム手袋、長靴、合羽 等 …… 逆性せっけん液（100 ～ 200 倍稀釈）
アルコール類（70％）

タモ、ブラシ等飼育器具類、池 …… 逆性せっけん液（100 ～ 200 倍稀釈）
塩素系消毒剤（サシ粉の場合 1,000 倍稀釈）

（2）種苗の健康管理

- 1）高密度飼育は避ける。
- 2）過度の給餌は避ける。必要に応じ、ビタミン、消化剤等の投与はした方が良い。
- 3）変質した可能性のある、あるいは病原菌に汚染された恐れのある飼・餌料は与えない。
- 4）飼育期間中に種苗間に成長の差が生じた場合には適度な間隔でサイズ選別を行い、極端にサイズの異なる魚の混入は避ける。なお、網ズレを避けるため、タモ網はできるだけ使わない。
- 5）種苗にストレスを与えることは極力避ける。
 - ・必要以上の選別は行わない。
 - ・魚の分養時等に塩水浴（1%以下）をすると良い。ただし、塩分が高くなるとアユに悪影響を及ぼすことがあるので注意すること。また、淡水への馴致は短時間で行わない。
 - ・不用意に魚を驚かせてパニック状態にさせない。
 - ・種苗を計量する時には、魚の量に対して可能な限り水の量を多くする。
 - ・種苗を池から分養する時、飼育水と外気の温度差が少ないようにした方が良い。
 - ・海産、人工種苗の場合、急激な淡水馴致は過度のストレスを与え、馴致後に冷水病の発生を引き起こしやすいので避ける。
- 6）頻繁に種苗の行動を観察し、異常行動を示す個体は速やかに飼育水槽から除去する。

（3）冷水病発生時の対応

- 1）冷水病が疑われる症状あるいは死亡が発生した場合には、瀕死魚や死亡魚を早急に取り除き、病気の蔓延防止に努めるとともに、各都道府県の魚病診断機関に診断を依頼する。
- 2）冷水病と診断されたら、効能が承認された水産用医薬品（スルフィソゾールナトリウム）の投与や加温処理を施し、病状が回復するまでは移動を避け、まず飼育場内での拡散防止に努める。
- 3）過密養殖や給餌過多が冷水病被害の増大をもたらすことから、飼育密度を下げ、餌を控え、飼育環境の浄化に努める。
- 4）冷水病菌の施設外への拡散を最小限にするため、感染魚や死亡魚等を排水路等に投棄せず、焼却等により処分する。

（予防、治療法及び種苗取扱い上の注意点）

- ・アユ冷水病は水平感染が比較的容易に成立するので、施設の消毒、取り除いた死亡魚や異常魚の処理、飼育水の飛沫や池の水漏れ防止など、日常の防疫活動には十分な注意を要する。
- ・アユの冷水病治療に対して効能が承認された水産用医薬品としてはスルフィソゾールナトリウム（商品名 イスランソーダ）がある。魚体重 1 kg 当たり 1 日 100 ～ 200mg

の当該薬剤を飼料に添加し、投与することによって、アユの冷水病に起因する死亡率は低下する。

なお、スルフィソゾールナトリウムは治療のために使用が認められており、予防投薬は認めていないので注意すること。

- ・冷水病の治療には、飼育水温を一時的に上昇させる加温処理が有効である。
- ・方法は2回加温で、加温水を徐々に注水して飼育水温を23℃で3日間維持し、通常水温に数日間戻した後に再度28℃で3日間維持する。
- ・23℃の加温処理は温度上昇にアユを馴致するためのものであり、高い治療効果は28℃の加温処理にある。
- ・冷水病菌は、魚体内や環境中に潜在する能力に長けている可能性があり、治療後しばらくして再発することがある。
- ・また、飼育池ではもちろん、輸送時においても、被害の軽減を図るため、極力、魚を高密度に収容しないことが望まれる。

(4) 冷水病発病魚の処分

- 1) 冷水病の症状のある個体は損傷しないように、丁寧に水槽から取り除く。
- 2) 冷水病発病魚は煮沸、焼却等によりの確に処理する。
- 3) 採集や処理に使用した器具、用具類は使用後直ちに消毒するとともに、手やゴム手袋、長靴、合羽等の消毒も同時に行う。

2. 種苗の輸送中及びその前後に関する疾病防除対策

(1) 種苗の取り上げに関する措置

- 1) 輸送前には餌止めを行う。輸送直前までの給餌や濃密飼育はしないようにする。
- 2) 種苗を池から輸送用水槽へ移す際には、急激な水温変化を避け、かつ、水温馴致期間を可能な限り長くとる。
- 3) 取り上げ及び計数は慎重に行い、可能な限りストレスの少ない方法を選択する。
- 4) スレ防止のため、網（網生け簀を含む）はなるべく使用せず、できるだけバケツ等で水ごとすくうようにする。
- 5) 輸送前の魚の健康状態を注意深く観察し、発病魚の輸送はしない（寄生虫の付着や冷水病以外の疾病等の異常も含めて）。

(2) 輸送に関する措置

- 1) トラック、活魚水槽などは、使用前後に必ず消毒する。洗浄、乾燥してから使用する。
- 2) 輸送時の種苗密度を可能な限り低くする。
- 3) 輸送時の水温の急激な変化を避ける。
- 4) 輸送距離に合わせて、収容密度や輸送方法を選択するなど、可能な限り種苗に無用のストレスをかけないように注意する。
- 5) 輸送トラックの同一水槽に、複数業者の魚を混ぜて収容しない。

- 7) アユの体型が小さいほど、水量当たりの輸送量を少なくする。
- 8) 輸送中は時々魚の状態や水温、酸素をチェックする。
- 9) 輸送中または輸送後には、薄い塩水浴（0.2 ～ 0.9 %）をすると良い。ただし、塩分が高くなるとアユに悪影響を及ぼすことがあるので注意する。また、塩水浴後の淡水への馴致は短時間で行わない。
- 1 0) 輸送中の過度のエアレーション及び酸素供給は、鰓に障害を与えるのでしないようにする。
- 1 1) 輸送中、水面に発生する泡はできるだけこまめに取り除く。
- 1 2) 輸送中、死亡魚や異常魚をこまめに取り除くとともに、死亡魚や異常魚を無処理のまま投棄しない。
- 1 3) 輸送時の水温や溶存酸素等、水質の管理を輸送担当者に徹底させる。

[補足説明]

- ・ 輸送時には、アユを池から「取り上げ」て「計量」し、トラックの水槽へ「高密度で収容」し、更に、走行するため「連続的な振動」があり、また排泄や呼吸等による「水質の悪化」が起こる。
- ・ これらは全て、アユにとって大きなストレスの原因となり、アユの状態を悪くして冷水病の発生を引き起こしやすくする。輸送のストレスを可能な限り小さくするように心がける。
- ・ 輸送中の排泄による「水質の悪化」や、餌の消化によるエネルギー消費を防ぐため、輸送前には必ず餌止めをする。
- ・ 輸送中に水面に出る泡には、アユの排泄に由来するアンモニア等の有害物質が吸着されている。このため、泡をこまめに取り除くことは、水槽水の水質悪化を軽減することにつながる。

3. 放流に関する疾病防除対策

(1) 放流時期・場所の決定

- 1) 河川水温や流量、餌となる付着藻類の状況等、河川の状況を継続的に記録する。
- 2) アユ豊漁年の河川の状況を基準として、当該年の放流時期や場所、回数、放流量を決定する。
- 3) 放流河川の水温の低い時期や水温変動の大きい時期、また濁水の出やすい時期の放流を避ける。
- 4) 降雨等により急激な水温変化が予測される時の放流は避け、水温が安定した状態になってから放流する。
- 5) 河川水が増水や、濁っている時、または濁ることが予想される時の放流は避ける。
- 6) 放流対象河川の水温上昇（日間最低水温が 13℃以上となる時）を目安に、それ以後の時期に放流予定量を数回に分けて、2週間程度の間隔をおいて放流するのが良い。

(2) 種苗の選択及び取扱い

- 1) 放流用種苗は種苗購入時に保菌検査結果から冷水病原菌の保菌がないことが確認された種苗を選択することを原則とする。
- 2) 放流時には輸送水槽内で可能な限り、河川水温に馴致させる。
- 3) 放流時のタモ網使用など、無用のストレスを種苗に与えない。
- 4) やむをえずタモ網などを使用する際でも、他車との共用をしない。
- 5) 放流現場に到着した時点で、冷水病を発症あるいは冷水病が疑われる症状が一部の個体で認められる輸送水槽の種苗は、一旦蓄養池等に移し、速やかに診断を受け、診断で陽性となった場合は、治療し陰性を確認した後放流する。
- 6) 死亡魚、異常魚を天然水域に投棄せず、焼却する等適切に処理する。

[補足説明]

- ・アユは放流される前に輸送されてくる。輸送は「取り上げ、計量」、活魚槽への「高密度収容」「水質悪化」、走行による「振動」などといった、アユにストレスを引き起こす様々な要素を含んでいる。
- ・放流場所に着いたアユは、これらのストレス要素にさらされた直後で、アユの側からすれば決して良い状態ではなく、むしろ冷水病が発生しやすい状態にある。
- ・そのため、放流に際してはこれ以上のストレスを与えて、アユの状態を更に悪くしないようにすることが肝要である。
- ・河川水との水温差、河川水の低水温、濁水、増水は全てアユに大きなストレスとなり、冷水病発病の引き金になるので、避けることが必要である。
- ・冷水病原菌が河川に残存している可能性を考えて、あらゆる面にわたってアユの取扱いに注意する。
- ・また、冷水病はアユからアユへと感染するので、死んだアユや瀕死のアユを放流すると、元気なアユまで感染する危険がある。
- ・放流予定日に予期せぬ出水等がある場合を考慮して、危険回避のため、数回に分けて放流する方が良い。
- ・「昔はこれぐらい大丈夫だった。」「今まで何度もやって大丈夫だった。」という放流の仕方は、今は通用しないと思って放流する方が賢明である。

(3) 放流にあたっての参考事例

- 1) 漁業協同組合では放流効果を上げることを意図して実際に様々な対策を行っている。最も効果のあったとする対策は「無病アユの確保・放流」と「適切な放流時期の決定」であったが、具体的には次のとおりである。
 - ・水温の上昇を計測して放流開始日を調整した。
 - ・放流場所を複数箇所に分けて放流した。
 - ・種苗の供給先まで行って、購入するアユの状態を確かめた。
 - ・放流回数を複数回に分けて放流した。
 - ・放流種苗のサイズをいろいろなサイズに分けて放流した。
 - ・付着藻類（こけ）の状況を観察して放流開始日を調整した。
 - ・放流前に魚病等の検査を行った。

- ・全体の放流量が減っても、冷水病のない種苗を放流した。
- ・放流種苗の購入先を信頼のできる1ヶ所だけにした。
- ・人工産、海産、琵琶湖産等の由来や、生産地（生産業者）が異なる種苗は、同一水系あるいは同一支流に放流しなかった。
- ・冷水病菌に感染していないと考えられる種苗ほど上流に放流した。

2) 川の付着藻類（こけ）の状況とアユ漁の善し悪しの関連について

- ・放流開始時にこけが良く付いているほど、解禁当初のアユの歩留まりは良かった。
- ・解禁当初のアユの歩留まりが良ければ、そのシーズン全般に良い結果であった。
- ・こけの成育は水温を含めた、河川の状況を判断する良い指標である。こけが良く付いてから放流することは、良い結果を得るための対策として、試してみる価値があると思われる。

Ⅲ. 防疫体制の確立

1. 防疫体制の整備

- (1) 本指針及び「アユ冷水病対策のポイント」を活用して、各都道府県の実状に合わせた普及啓発を推進する。
- (2) 防疫体制を強化するために、別添来歴カードの確実な普及を図る。なお、様式については各都道府県の実状に合わせて変更可とする。

[補足説明]

来歴カードについて

冷水病の被害を軽減するためには、どのような来歴を持つ種苗が良好な水揚げをもたらすのかを知ることが大切である。そのためには、種苗の来歴を記録する必要がある。この来歴を記録した用紙を来歴カードという。

来歴カード（用紙は各都道府県の水産試験研究機関で配布）は種苗供給施設の一つの池で同時に飼育する種苗ごとに作成し、種苗を出荷する際に、来歴カードを添付する。なお、一つの池の種苗をいくつかの移送先へ送付する場合は、それぞれの移送先への送り状に来歴カード（コピーで可）を添付する。また、複数の池の種苗を混合して移送する場合は、混合した全ての種苗の来歴カード（コピーで可）を送り状に添付する。

種苗移動の各段階で来歴カードに必要事項を記入する。また、放流事業者や養殖事業者など、最終的に種苗を受け取った事業者は、添付されてきた来歴カードに、その年の釣果や水揚げの良否等を記入して、各都道府県の水産試験研究機関に送付する。

2. おとりアユについて

おとりアユを介した冷水病の拡大を防ぐため、おとりアユの防疫について普及啓発を図る

- (1) 冷水病の恐れのないアユをおとりとして販売する。
- (2) 未発生水域では、他水域からのおとりを持ち込まない。
- (3) 発生水域では、他水域へおとりとして持ち出さない。

[補足説明]

遊漁者が注意すべき事項

- ・ 体表に異常が認められたり、元気がないおとりアユは購入しない。
- ・ 釣ったアユ、おとりアユはすべて持ち帰る。
- ・ 他の河川でおとりアユとして購入したアユ、他の河川で釣ったアユは、おとりアユとして使用しない。
- ・ タモ網、引き舟、タビ、ウェーダー等は、使用后、洗浄・乾燥したあと、アルコール等により消毒する。

培養によるアユ冷水病菌の検出

釣菌部位

死因の特定	腎臓、病患部
保菌検査	エラと腎臓、可能なら脳も加える

培地

改変サイトファーガ培地を用いる。エラの場合は、雑菌の繁殖を制御するために、トブラマイシン $5\mu\text{g/mL}$ を添加した培地を用いる。培地原料はディフコ社製を用いる（血清は添加しない）。血清を添加する場合は明記する。

薬剤（サルファ剤）感受性試験には、血清添加培地は用いない。

培養温度

18℃とする（腎臓や脳）。

エラや病患部からの細菌分離では、カビや雑菌が繁殖し、保菌検査が困難なことが多いため、低温で培養し、温度条件を明記する

培養菌の確認

コロニーの観察は必須であり黄色のコロニーを形成する長桿菌である。菌の同定はPCR法（資料2）により行い、確定する。

また、抗血清を用いた凝集試験などは検査者の手慣れた方法で行う。

（この場合、検査法を明記する。）

PCR によるアユ冷水病診断

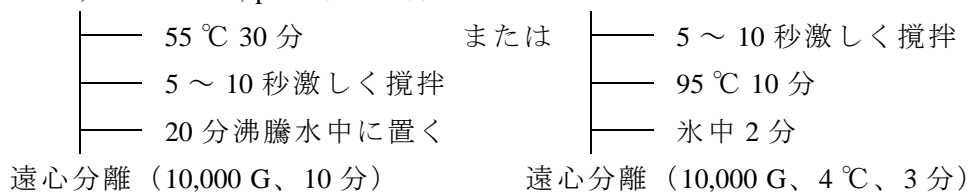
新たに開発されたロタマーゼ遺伝子群に 1 つの PPIC (peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C) 遺伝子をターゲットとした PCR (以下、ロタマーゼ法と略す) が陽性である場合を確定とする。また、必要に応じて遺伝子型分けも実施する。本ターゲットは Izumi ら (2003) が発見した遺伝子断片であり、吉浦ら (2006) が同定して検出用 PCR を改良した。なお、従来の 2 つの PCR による方法 (下記の方法 1、方法 2) やその他の PCR 等も診断には使用できるが、菌の遺伝子型分けには使用できない。

テンプレート (試料) の調製

培養法 (資料 1) により得られたコロニーを用いる。

やむをえない場合には腎臓、病患部またはエラを検体とする。この場合、200 μ L の STE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を加え、ホモジナイズする (エラについては別記の方法で洗浄濃縮液を試料として用いた方が検出感度が高い)。

コロニー、10 μ L ホモジネートまたはエラ洗浄濃縮液を、300 μ L 5% Chelex100 または 300 μ L TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) と混合



上澄みをテンプレートとして使用する (テンプレートは 4 °C で保存可)。

* DNA の抽出には他の方法、例えば、ISOGEN または DAN 精製用のカラム (QIAamp DNA Mini kit 等) を用いる方法でも可。

ロタマーゼ法：吉浦ら (2006)

A) 増幅

PCR 反応液組成：20 μ L

テンプレート	1 μ L
10 x <i>Ex Taq</i> buffer	2 μ L
2.5mM dNTPs Mixture	0.8 μ L
Forward Primer (10 μ M) *1	1 μ L
Reverse Primer (10 μ M) *2	1 μ L
<i>Ex Taq</i> (5 unit / μ L) *3	0.1 μ L
滅菌 DW	14.1 μ L

*1: fpPPIC1F 5'-GTACCATGATACAGTCAGGTTTTTATACCA-3' 30 mer

*2: fpPPIC1R 5'-GCGTTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCG-3' 27 mer

*3: Takara *Ex Taq* Hot Start Version (5 unit / μ L)

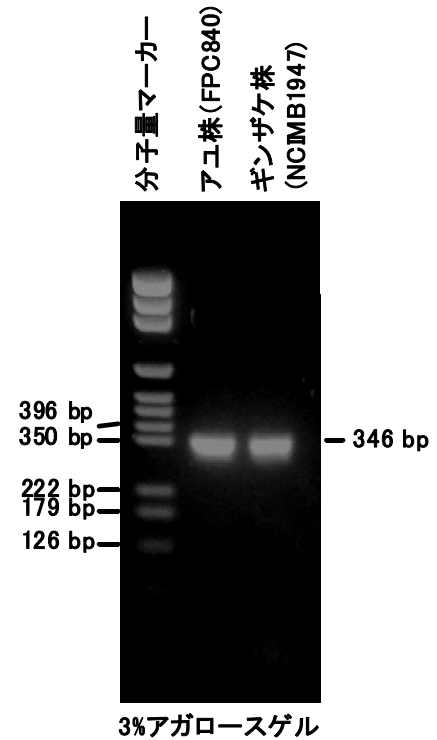
PCR 条件

- ① 95 °C 1 分
- ② 次を 35 回
95 °C 15 秒、60 °C 30 秒、72 °C 30 秒
- ③ 終了後は 4 °C で保持 (オプション: 鋳型 DNA サンプルが薄い と予想される場合は、40 サイクルまで サイクル数を増やして PCR 反応を行う。)

B) PCR 増幅産物のチェック

前項 A) の PCR 後の反応液 (3 μ L) を試料として、3% アガロースゲルを用い、定電圧 100 V、25 分間の条件で電気泳動を行い、PCR 増幅産物の有無を確認する。

判定: 346 bp の増幅産物が認められた場合、陽性とする (右図)。



C) PCR 増幅産物の制限酵素処理

制限酵素処理反応液組成: 10 μ L

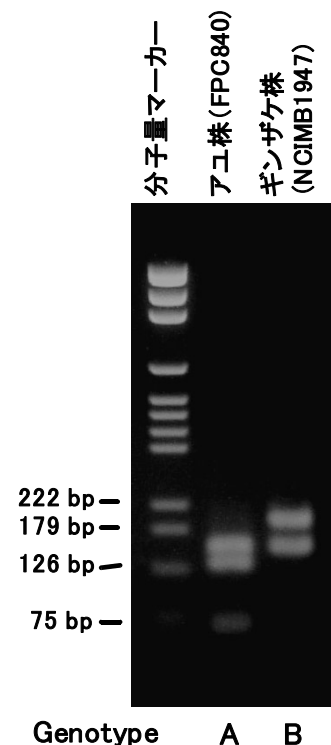
- | | |
|--|-------------|
| PCR 反応液 (増幅産物が十分量あるもの) | 5 μ L |
| 10 x H buffer (<i>Hinf</i> I に添付してあるもの) | 1 μ L |
| 制限酵素 <i>Hinf</i> I (10 unit / μ L) | 0.2 μ L |
| 滅菌 DW | 3.8 μ L |

前項 B) で十分量の増幅産物 (ハッキリとしたバンド) が確認できたものは、制限酵素 *Hinf* I による増幅産物の消化を行う。上記制限酵素処理反応液を調整し、37 °C で 2 時間インキュベートする。(反応液量が少ないので、汎用インキュベーターまたは PCR 装置を 37 °C に設定して使用する。ウォーターバスは、チューブのフタ内側に水滴が付いて反応液量が増えることにより、結果が安定しない場合があるので、なるべく使用しない。)

D) *Hinf* I 消化断片長の違いによる遺伝子型の解析

前項 C) で作製した消化液 (3 μ L) を試料として、3% アガロースゲルを用い、定電圧 100 V で 30 分間電気泳動を行い、PCR 増幅産物の消化断片長と種類を確認する。

判定: 63 bp, 129 bp, 154 bp の 3 つの断片が認められる場合は遺伝子型 A、192 bp, 154 bp の 2 つの断片が認められる場合は遺伝子型 B と判定する (右図)。



吉浦康寿・釜石 隆・中易千早・乙竹 充 (2006): Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41 (2), 67-71.

(別記) エラ洗浄濃縮液の作り方

エラに 3 mL の PBS (−) を加え、30 秒激しく攪拌
↓
エラだけを取り出す
↓
遠心分離 (500 G、4 °C、10 分)
↓
上清を別のチューブに移す
↓
遠心分離 (10,000 G、4 °C、10 分)
↓
上清を捨てる
↓
遠心分離産物を 50 μL の PBS (−) に懸濁させ、10 μL を試料として用いる
※ 10 尾をプールし、1 検体として分析可能

従来の方法

方法 1 : Toyama *et al.* (1994)

1 回目の増幅を行なう (プライマーは 20F と 1500R を用いる)

容器中に以下の溶液を混合する

x10 PCR 緩衝液	1.00μL
dNTP Mix (各 2.5 mM)	0.80
20F (10 μM)	1.00
1500R (10 μM)	1.00
Taq DNA ポリメラーゼ	0.05
テンプレート	2.00
DW	4.15

計 10.0 μL

プレヒーティング 94 °C、 5 分
 増幅は 30 回
 熱変性 94 °C、 30 秒
 アニーリング 51 °C、 90 秒
 伸張 72 °C、 120 秒
 最終サイクル 72 °C、 5 分
 終了後は 4 °C で保持

1 回目の増幅後、1/10 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) で 5% に希釈し、2 回目のテンプレートとする

2 回目の増幅を行なう (プライマーは PSY-1 と PSY-2 を用いる)

容器中に以下の溶液を混合する

x10 PCR 緩衝液	2.00 μ L
dNTP Mix (各 2.5 mM)	1.60
PSY-1 (10 μ M)	2.00
PSY-2 (10 μ M)	2.00
Taq DNA ホリメラーゼ	0.10
テンプレート	4.00
DW	8.30
	計 20.0 μ L

プレヒーティング 94 °C、 5 分
 増幅は 30 回
 熱変性 94 °C、 30 秒
 アニーリング 51 °C、 90 秒
 伸張 72 °C、 120 秒
 最終サイクル 72 °C、 5 分
 終了後は 4 °C で保持

プライマー

20F : 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

1500R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

PSY-1 : 5'-CGATCCTACTTGCGTAG-3'

PSY-2 : 5'-GTTGGCATCAACACACT-3'

Takashi Toyama, Kumiko kita-Tsukamoto and Hisatsugu Wakabayashi (1994): Identification of *Cytophaga psychrophila* by PCR targeted 16S ribosomal RNA. *Fish Pathology*, **29** (4), 271-275.

方法 2 : Izumi and Wakabayashi (2000)

増幅 (プライマーは PSY-G1F と PSY-G1R を用いる)

容器中に以下の溶液を混合する

x10 PCR 緩衝液	1.00	μL
dNPT Mix (各 2.5 mM)	0.80	
PSY-G1F (10 μM)	1.00	
PSY-G1R (10 μM)	1.00	
Taq DNA ポリメラーゼ	0.05	
テンプレート	2.00	
DW	4.15	
	計 10.0	μL

増幅は 35 回	プレヒーティング	94 °C、	5 分
	熱変性	94 °C、	60 秒
	アニーリング	56 °C、	60 秒
	伸張	72 °C、	120 秒
	最終サイクル	72 °C、	5 分

終了後は 4 °C で保持

プライマー

PSY-G1F : 5'-TGCAGGAAATCTTACTCG-3'

PSY-G1R : 5'-GTTGCAATTACAATGTTGT-3'

Shotaro Izumi and Hisatsugu Wakabayashi (2000): Sequencing of *gyrB* and their application in the identification of *Flavobacterium psychrophilum* by PCR. *Fish Pathology*, **35** (2), 93-94.

電気泳動

1%アガロース電気泳動で産物を検出する。

アガロースはゲル強度約 1,500 g / cm³ を使用する

7 ~ 8 V / cm で約 30 分間通電する

泳動用サンプル : 10 μL PCR 産物 + 3 μL トラッキング色素液

(マーカーとして宝酒造の pHY マーカー (#3404A) などを使用する)

トラッキング色素液	2% SDS
	25% Ficoll

0.125% BPB
40 mM Tris-HCl
5 mM EDTA

(トラッキング色素液は、制限酵素購入等の際に付属してくるもので良い)

泳動緩衝液 TAE buffer (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH8.0)

泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、UV (302 nm)透過光で観察または写真撮影。

判定：1,089bp (方法1の場合) または 1,017bp (方法2の場合) の所に明瞭なバンドがあれば陽性。

その他の PCR 等

下記の論文に、上記以外の PCR 等が紹介されている。

PCR

Urdaci, M. C., C. Chakroun, D. Faure and J. F. Bernardet (1998): Development of a polymerase chain reaction assay for identification and detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Research in Microbiology*, **149**, 519-530.

del Cerro, A., I. Marquez and J. A. Guijarro (2002): Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5177-5180.

Ballarda, A., D. Faure and M. C. Urdaci (2002): Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 510-516.

定量 PCR

del Cerro, A., M. C. Mendoza and J. A. Guijarro (2002): Usefulness of a TaqMan-based polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology*, **93**, 149-156.

LAMP

永田恵里奈・江口 充(2007): 環境水におけるアユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング. 日本水産学会誌, **73**(2), 306-309.

安中敏光・小島 禎・池戸正成・吉浦康寿 (2007): LAMP 法による *Flavobacterium psychrophilum* (冷水病菌) の検出. 平成 19 年度日本魚病学会講演要旨集, p49.

あゆ種苗来歴カード(例)

このカードは、アユ冷水病対策を目的に実施している
ものです。正確な記入にご協力ください。

記載要領

○このカードは出荷種苗のロットごとに作成し、出荷種苗に
添付して下さい。

○出荷種苗の種類や採捕・受入時期等が複数にわたっている
ものについても、該当する事項を全てチェックしてください。

○蓄養・育成期間については、そのロットの中で最も長い種
苗のものを記入してください。

○このカードは、各段階において写しを保存し、放流者にお
いて水産試験場等に送付してください。

1 生産(生産者記入)

①種苗の種類

人工産(経代飼育した親から採卵)

親の由来 _____

人工産(採捕した親から採卵)

親の採捕場所 _____

琵琶湖産 海から遡上 ダム・湖沼産

種苗の採捕場所 _____

その他 _____

②採捕・受入・採卵の時期及びサイズ

_____ 月 _____ 日 ~ _____ 月 _____ 日

_____ g/尾

③蓄養育成時の魚の状態

冷水病 発生しなかった 発生した

他の魚病 発生しなかった 発生した

④種苗の冷水病の処置

投薬(_____回) 加温処理 無処理

⑤出荷時の状況

出荷月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

出荷量 _____ kg (_____尾)

出荷サイズ 平均 _____ g/尾

⑥その他(種苗の移動等があればわかる範囲で記入する)

記入者 住 所
生産者名
電 話

2 中間育成生産(生産者記入)

①中間育成開始時期の密度・水温

_____ kg/m³ _____ °C

②中間育成時の魚の状態

冷水病 発生しなかった 発生した

他の魚病 発生しなかった 発生した

③種苗の冷水病の処置

投薬(_____回) 加温処理 無処理

④出荷時の状況

出荷月日 _____ 年 _____ 月 _____ 日

出荷量 _____ kg (_____尾)

出荷サイズ 平均 _____ g/尾

⑤その他(種苗の移動等があればわかる範囲で記入する)

記入者 住 所
生産者名
電 話

3 種苗を放流又は養殖するための輸送(輸送者記入)

①輸送密度・輸送時間(放流終了まで)

_____ kg/m³

_____ 時間 _____ 分

②輸送水温

出発時 _____ °C 到着時 _____ °C

③その他

記入者 輸送者名

4 放流(放流者記入)

①放流場所 _____ 川

(_____ 地区 ~ _____ 地区)

②到着後から放流までの期間

すぐ放流した _____ 日間蓄養後放流

③河川の状態

河川水温 _____ °C

水 量 多い 通常 少ない

濁 り ある 少しある ない

④その他(魚の状況等)

記入者 漁協名
立会代表者