

II 保菌魚（種苗）からの検出

1. 注意事項

- ・ 資料2 アユの冷水病の診断 I. 診断にあたっての注意事項を参照

2. 必要な実験装置と試薬類

1) 試薬・実験器具



- ・ 解剖器具
- ・ 火炎滅菌用器具（アルコールランプ等）
- ・ アルコール綿
- ・ 魚体重測定用電子天秤
- ・ 滅菌缶



- ・ 滅菌綿棒
- ・ 50 mL 遠沈管または小試験管（滅菌済み）
- ・ マイクロピペット（滅菌済み）
- ・ 三角フラスコ
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ（滅菌済み）
- ・ SS 寒天培地



PCR 関連試薬・器具一式

- ・ 酵素（TaKaRa EX Taq Hot Start Version 等）
- ・ プライマーセット（線毛遺伝子上流部位）
- ・ 陽性対照（養殖研より配付）
- ・ その他、PCR 関連器具

2) 実験機器・装置

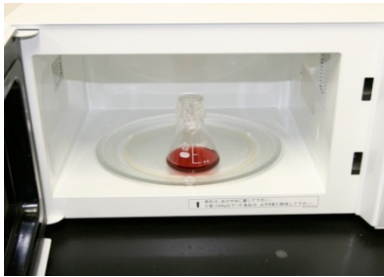
- ・ 遠心機および高速微量遠心機
- ・ 電子レンジ
- ・ インキュベータ
- ・ ブロックインキュベータ
- ・ PCR 関連機器・装置
- ・ オートクレーブ

3. 手技

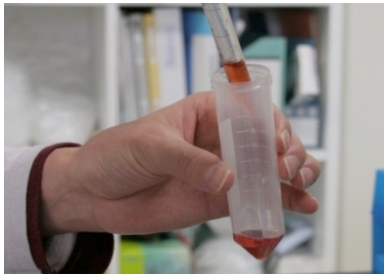
1) SS 液体培地（選択増菌培地）の作製



- ⑨ 50 mL 遠沈管内で、市販の SS 寒天培地を蒸留水に溶解し、その後約 1,500 rpm (400 g)、1 分間の遠心により、寒天を沈殿させる。ピペット等でその上清を三角フラスコに移す。



- ⑩ フラスコにラップをかけ、電子レンジを使って、培地を軽く沸騰させる。ラップに孔を開けておくと、突沸を防ぐことができる。



- ⑪ 滅菌した遠沈管または小試験管に上記の SS 液体培地を無菌的に分注する。適量は 50 mL 遠沈管で 5 mL、小試験管で 3 mL 程度である。分注後は蓋をして、使用時まで冷蔵で保存する。

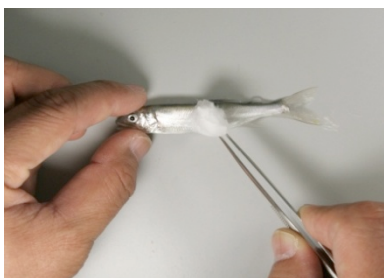
2) 魚の解剖と増菌培養

検査魚のサイズにより、解剖の手技が異なる。

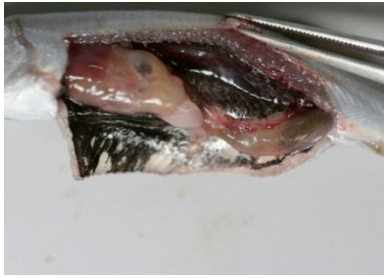
(1) 全長 5 cm 以上の検査魚の場合



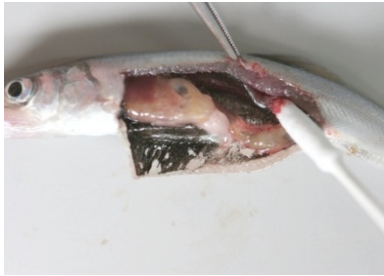
- ① 解剖器具をアルコールランプ等で火炎滅菌する。



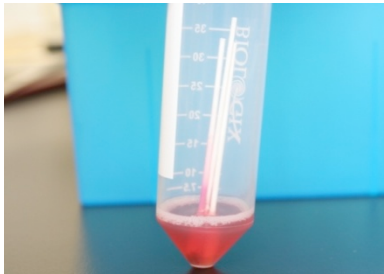
- ② きつく絞ったアルコール綿で、魚体表を拭く（軽く粘液を拭う程度）。



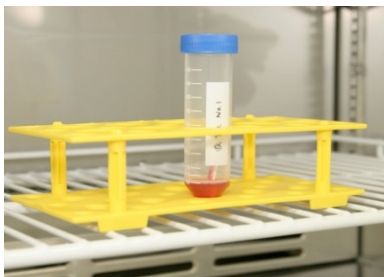
- ③ 火炎滅菌した解剖器具を用いて、肛門より前方の位置から、側線に沿って前方に切開し、開腹する。



- ④ 滅菌綿棒を用いて、体腎（背鳍基部後端の下方に位置する背骨の腹側に張り付いている）を削ぎ取る。



- ⑤ SS 液体培地の入った遠沈管または小試験管に腎組織の付着した綿棒を移入する。同じロットの検査魚からの綿棒を1本の遠沈管にプールしても構わない。



- ⑥ 遠沈管（または小試験管）の蓋が閉まるように、綿棒の先端を切り取り、蓋をして、25℃で24時間培養する。



- ⑦ 蓋を開け、遠沈管（または小試験管）内の綿棒を除去し、滅菌缶に捨てる。



- ⑧ 再び蓋を閉め、軽く震とう攪拌して、細菌を懸濁させる。さらに、1,000 rpm (180 g)、3分間の遠心により組織片を沈殿させる（細菌は沈殿しない）。



- ⑨ 培地上清 1 mL を 1.5 mL のマイクロチューブに移入する。



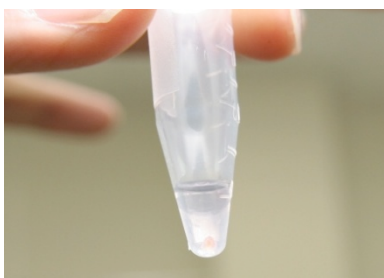
- ⑩ 5,000rpm (2,430 g)、5 分間の遠心により、細菌を沈殿させ、ピペットを用いて、上清 (SS 培地) を除去する。



- ⑪ D.W. (遺伝子実験用) を 100 μ L 添加し、ピペッティングにより細胞を懸濁させる。

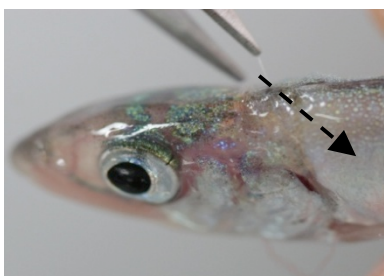


- ⑫ ブロックインキュベータを用いて 100°C で 5 分間加熱する (熱抽出)。

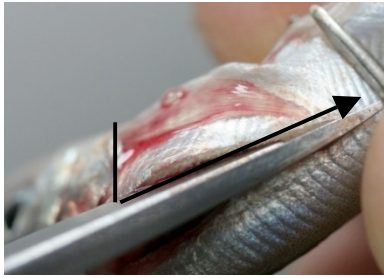


- ⑬ 10,000 rpm、5 分間、4°C で遠心し、その上清を PCR 用テンプレートとする。

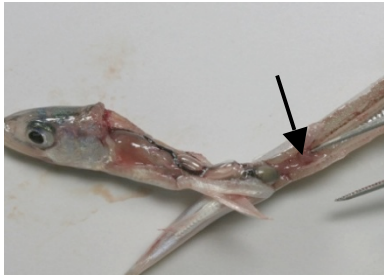
(2) 全長 5 cm 以下の検査魚の場合



- ① 解剖ハサミを用いて、頭部後方より背骨に達するまで切断する。



- ② 消化管を傷つけないように気をつけながら、両腹側を側線に沿って切開する。



- ③ 体腎が露出したら、前述の 1) ④ 同様に綿棒で腎臓を削ぎ取る。矢印の先端が体腎部。以降、前述の (1) ⑤ に続く。

3) PCR 法による *E. ictaluri* の検出

作製した PCR 用テンプレートを用いて PCR を行う。反応液組成、プライマーの塩基配列、反応条件については、I 病魚からの検出-3) PCR 法による菌種の同定を参照。

ディフクイック染色による異型細胞の鑑別

異型細胞性鰓病（以下：AcGD）の発生時には迅速に本病か否かを診断する必要がある。そのため、鰓の上皮組織に形成される本病に特徴的な異型細胞を鑑別するためにディフクイック染色を行い、その結果により以後の対処法を選択する。

1. 材料

ディフクイック染色液（シスメックス株式会社）（固定液、染色液1、染色液2のセット）
解剖用具（ピンセット、ハサミ）
スライドガラス
染色液を入れる瓶（蓋があるものが良い）

2. 方法

供試魚は瀕死の魚を採取し、直ちに検査に供する。瀕死魚が得られない場合にはやむを得ず死後間もない魚を使用する。

- ① 鰓蓋をハサミで切り取り鰓を一枚切り出す。この時に鰓弁をピンセットでつかまないように気をつける。
- ② スライドガラス上に鰓をスタンプする。3列程度スタンプするのが適当。
- ③ スライドガラスにドライヤーの冷風を当てて十分に乾燥させる（熱を加えないこと）。
- ④ 完全に乾燥したスライドガラスを固定液に入れ、ゆっくり上下させ液に5回（秒）くぐらせる。
- ⑤ 染色液1にスライドガラスをゆっくりと5回（秒）くぐらせる。
- ⑥ 染色液2にスライドガラスをゆっくりと5回（秒）くぐらせる。
- ⑦ スライドガラスをきれいな水で洗浄し、染色液を落とす。ドライヤーの冷風で乾燥後、光学顕微鏡で検鏡し、異型細胞の有無、細菌の有無を観察する。

3. 診断

異型細胞のみが観察された場合はAcGD。長桿菌のみが観察された場合は細菌性鰓病(BGD)と簡易診断する。両者が観察された場合は、AcGDとBGDの混合感染と簡易診断する。

・ 異型細胞の特徴

赤血球の数倍～数十倍の大きさを呈する。

細胞質は弱好塩基性から弱好酸性を呈する。また細胞質に空胞が認められる場合もある。

核/細胞質比が高い。

資料 4-2

PCR 法による異型細胞性鰓病 (ACGD) 原因ウイルス PaPV ならびに 細菌性鰓病 (BGD) 原因菌の検出法

鰓スタンプのディフクイック染色による簡易診断ののち、ACGD 原因ウイルス PaPV や、BGD 原因菌を PCR 法により検出し、確定診断を行う。

1. 材料

- ・ 瀕死魚あるいは死亡後間もない新鮮なアユの鰓を材料とする。すぐに核酸抽出が行えない場合は、使用時まで凍結もしくは 99.5%エタノールで固定し保存する。

2. 方法

1) 核酸抽出

米粒大の鰓組織から市販の DNA 抽出キット等で DNA を抽出する。

2) PCR 法

(1) PaPV 検出 PCR : 渡邊ら, (2007)*1

・ PCR 反応液組成

テンプレート DNA	1.0 μ L
10 x <i>Taq</i> buffer	1.0 μ L
2.5mM dNTPs Mixture	0.8 μ L
2.5mM MgCl ₂	0.6 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ L
<i>Takara Taq</i> (5 unit / μ L)	0.05 μ L
滅菌 DW	5.55 μ L
合計	10.0 μ L

・ プライマーセット

BOKE30-F : 5'-CGA-TAT-CAT-ATC-TGT-GAT-CG-3'
BOKE30-R : 5'-AAT-GTT-GAT-GTG-TCC-AGG-AT-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング 95°C 2分
熱変性 95°C 15秒 \downarrow
アニーリング 57°C 30秒 \downarrow 35 サイクル
伸長 72°C 30秒 \downarrow
最終サイクル 72°C 3分
終了後は 4°C で保持

・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液 5 μ L を EtBr 溶液添加 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、302bp の PCR 増幅産物を確認する。

*1: 渡邊房子・福田穎穂・渡辺裕介, アユの「ボケ病」に関する研究-ボックス様ウイルス粒子について-. 平成 19 年日本水産学会春季大会講演要旨集, 2007;p221

(2) BGD 原因菌検出 PCR : Toyama *et al.*, (1996)*2 を改変

・ PCR 反応液組成

PaPV 検出の反応液組成に準ずる

・ プライマーセット

BRA1 : 5'-ACT-TCT-ICG-AGT-AGA-AG-3'

1500R : 5'-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'

・ PCR 条件

プレヒーティング	94°C	2 分	
熱変性	94°C	15 秒	┘
アニーリング	45°C	30 秒	┘ 40 サイクル
伸長	72°C	30 秒	┘
最終サイクル	72°C	3 分	
終了後は 4°C で保持			

・ PCR 増幅産物の電気泳動

PCR 後の反応液 5 μ L を EtBr 溶液添加 1.0% アガロースゲルで電気泳動を行い、1057bp の PCR 増幅産物を確認する。

*2: Toyama, T., T. K. Kita, and H. Wakabayashi, Identification of *Flexbacter maritimus*, *Flavobacterium branchedophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR Targeted 16S Ribosomal DNA. Fish Pathol, 1996, 31:25-31.

あゆ種苗来歴カード(例)

このカードは、アユの疾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ください。

○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、放流者においては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
ドクダエ・ウチカゲ感染症
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
ドクダエ・ウチカゲ感染症
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

河川の水温 _____ °C
水量 多い 通常 少ない
濁り ある 少しある ない

④魚の状況 好調・普通・不漁

記入者	漁協名
	立会代表者