

ニジマス養魚場の飼育水中における細菌性冷水病原菌の定量的モニタリング

中村永介^{*1}

ニジマス養魚場で発生する細菌性冷水病の対策のため、養魚場の飼育水中における原因病原体の増減のモニタリングを目的とした。本研究ではその基礎実験として、湧水、地下水及び河川水を用水とする3ヶ所のニジマス養魚場をモデルとし、年間を通して定量的リアルタイムPCRによる飼育水中の冷水病原菌の定量を試みた。既知菌濃度の冷水病原菌懸濁液を作製し、菌数とqPCRのサイクル数との相関から作成した検量線を用いることで、飼育水の菌濃度の推定が可能であり、簡易的な定量法としてモニタリングに有効であった。また、推定された養魚場の飼育水の菌濃度は平均 $10^5 \sim 10^6$ CFU/Lであり、周年検出されたことから、冷水病原菌の養魚場中での常在が明らかとなった。

キーワード：細菌性冷水病、定量的リアルタイムPCR、環境DNA、ニジマス養殖、飼育水

Flavobacterium psychrophilum (以下冷水病原菌という)を原因菌とする細菌性冷水病は、1940年代に北米のサケマス孵化場において初めて報告された¹⁾。日本では1987年に養殖アユから本菌が分離されたのち²⁾、1990年にはギンザケ稚魚からも確認されている³⁾。冷水病原菌はグラム陰性好気性長桿菌で、血清型により大きく3タイプに分けられ、0-1型はギンザケ由来、0-3型はニジマス由来に集中し、0-2型はアユ由来のみと報告されている^{*2)}。症状は魚種や成長段階によって異なるが、ニジマスでは鰓や肝臓、腎臓の貧血が観察され、体側や尾部に穴あき様の潰瘍を示す場合がある⁴⁾。現在では全国各地で発生していて、内水面におけるサケ科魚類における診断件数では、IHNと並び多くの割合を占めており⁵⁾、被害額も大きい問題となっている。対処法としては、抗生物質(水産用医薬品)の投与が有効である。魚病被害の低減には早期の発見と対策が重要であるが、発生初期の兆候を捉えることは難しい。

定量的リアルタイムPCR(以下qPCRとする)は、PCRによって増幅したDNAの蛍光強度を経時的に測定することで、サンプル中に含まれる標的DNAを精度良く定量する

ことが可能となる。qPCRと環境DNAによる生物検出法⁶⁾を組み合わせることで、天然河川における環境水中の冷水病原菌を定量する⁷⁾など、病原体のモニタリングにも適している。養魚場で感染症が発生した場合には、感染した魚体から病原体が排出され、飼育水中には通常よりも高濃度の病原体が存在しているため、飼育水中における病原体の増減をモニタリングすることで、疾病発生の動向を捉えることが可能となると考えられる。ブリ類養殖においては、魚病の早期発見を目的として環境DNAからの病原体遺伝子の検出の試みがなされている⁸⁾。本研究ではその基礎実験としてニジマス養魚場を調査場所とし、qPCRを用いた飼育水中における冷水病原菌の定量とモニタリングを試みた。

材料及び方法

供試水

湧水、汲み上げた地下水、湧水を水源とする河川水を用水としている富士宮市内の3ヶ所のニジマス養魚場(A, B, C)を調査場所とし、用水と飼育水を検体とした。A養

2022年2月7日受理

静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場業績第54号

^{*1}静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場

^{*2}アユ冷水病対策協議会とりまとめ

http://www.maff.go.jp/j/syuan/suisan/suisan_yobo/ayu_reisui/pdf/matome_2008.pdf

魚場の用水は採水せず、B養魚場とC養魚場は取水口から採水した。飼育水は各養魚場の最下流に位置する飼育池の排水部から採水した。採水した検体はチャック付ポリ袋に入れ、氷冷して実験室に持ち帰った。採水は上記の5箇所において、2020年1月から2021年4月にかけて毎月1回の計16回行い、採水時に飼育水の水温を測定した。

DNA抽出

用水及び飼育水は、1LをGF/F GLASS MICROFIBER FILTERS 47mm(cytiva)で吸引濾過したのち、フィルター付着物からDNAを抽出した。DNAの抽出にはDNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN)を使用し、付属のBuffer AE 100 μ Lに溶出したものをDNA試料とした。

コントロール(既知菌数の水抽出DNA溶液)の作製

用水及び飼育水中の冷水病原菌数を定量するため、A養魚場で分離された冷水病原菌を用いて、既知菌数の水から抽出したDNA溶液(以下W.STDとする)を作製した。改変サイトファージ寒天平板培地で16 $^{\circ}$ C、72時間培養した概ね対数増殖期にあたる冷水病原菌を集菌して蒸留水に懸濁し、10倍の段階で希釈した冷水病原菌懸濁液を8段階作製した。100 μ Lを改変サイトファージ寒天平板培地に塗抹して単位水量あたりの生菌数(Colony Forming Unit, 以下CFUとする)を求めた。用水及び飼育水と同法でDNAを抽出し、W.STD($4.50 \times 10^1 \sim 4.50 \times 10^8$ CFU/L)を作製した。

qPCR

qPCRにはPPIC遺伝子領域をターゲットとしたプライマーセットを用いた(表1)⁹⁾。検量線の作成にはPCR産物を用いた。PCR反応液の組成は、2x Go Taq Master Mix(Promega)10 μ L、各プライマー溶液(終濃度200nM)、DNA溶液1 μ L、滅菌蒸留水で20 μ Lとし、反応条件は、95 $^{\circ}$ C 10秒間の熱変性後、2ステップサイクル(95 $^{\circ}$ C 5秒間、60 $^{\circ}$ C 30秒間)を35サイクル行った。増副産物はMagNA¹⁰⁾で精製したのち、QuantusTM Fluorometer(Promega)によりDNA濃度を測定した。DNA濃度と分子量及びアボガドロ定数からコピー数を算出し、10倍の段階で8段階に希釈したものを既知コピー数PPIC遺伝子DNA溶液(以下STDとする： $3.72 \times 10^0 \sim 3.72 \times 10^7$ copies/ μ L)とした。

qPCRは以下のとおり実施した。反応液の組成は、2x TB Green Ex Taq Master Mix(Takara)5 μ L、各プライマー溶液(終濃度200nM)、DNA溶液1 μ L、滅菌蒸留水で10 μ Lとした。qPCRの反応条件はPCRと同様とした。反応は96ウェルプレートで行い、用水及び飼育水から抽出したDNAの他、STD及びW.STDを1サンプルにつき2ウェルにアプライした。qPCR反応はLightCycler[®]96 system(Roche)で行い、解析はLightCycler[®]96 Application software(Roche)の絶対定量解析法により実施した。

結果

水温

採水場所別の水温を図1に示した。湧水を用いるA養

表1 プライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Product size	Accession No.
PPIC-Q-F	CCTTCGATGTAGTTTCTGTGCCATA	131	AB254195
PPIC-Q-R	TTCTAATTCACGAGATTCGTCTGCT		

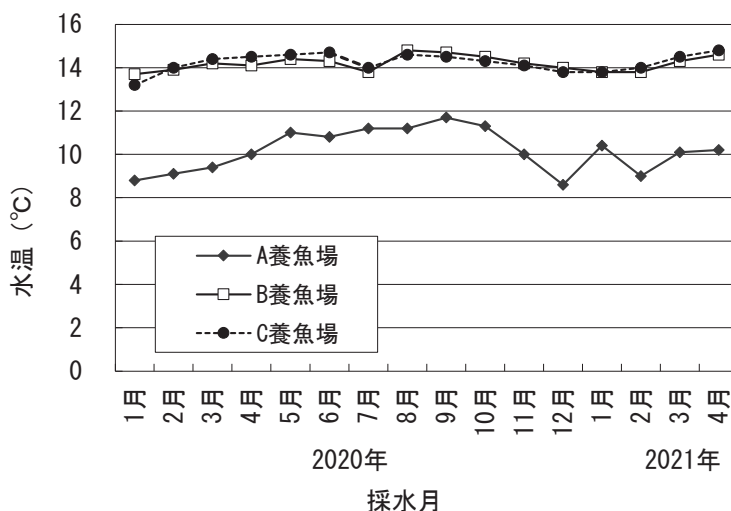


図1 採水場所別の水温変化

魚場の水温は8.6～11.7℃と低く、地下水を用いるB養魚場と河川水を用いるC養魚場の水温は13.2～14.8℃であった。いずれも年間を通してほぼ安定していた。

qPCRによる増幅効率と定量性の検討

STDは $3.72 \times 10^1 \sim 3.72 \times 10^7$ copies/ μ Lの範囲で傾きが-3.5551, Y切片が38.28, 相関係数 R^2 値が0.98となる検量線が得られ, PPIC遺伝子のコピー数とqPCRのサイクル数との間に強い負の相関が認められた。

qPCRのサイクル数とW. STDとの相関関係を図2に示した。生菌数yとサイクル数ctとの回帰式は $y = 9.12 \times 10^{14} e^{-0.7758ct}$, R^2 値は0.96となり強い負の相関が認められた。なお, 生菌数が 4.50×10^2 CFU/L以下では蛍光を検出できない場合があったため, 検出限界として以降の解析結果からは除外した。

qPCRによる養魚場における冷水病原菌数の推定

qPCRにより推定した月別の養魚場における冷水病原菌数を図3に示した。用水では, 地下水のB養魚場では周年検出限界以下であった。一方, 河川水のC養魚場では毎回 10^3 CFU/L以上検出され, 高い値を示した2020年1～3月及び2021年1月には同養魚場の飼育水と同程度の約 10^6 CFU/Lであった。飼育水では, 2020年1～4月は全ての養魚場で 10^6 CFU/Lを超え, A養魚場では1月に, B養魚場とC養魚場では4月に最高値となった。その後はA養魚場とB養魚場では7月にも高い数値を示したが, 8～12月にかけて低くなり, 最低値となった10月には全ての養魚場で 10^5 CFU/Lを下回った。期間中に検出限界以下となったのはB養魚場における12月の1回のみであった。期間中の平均値は, A養魚場 4.23×10^6 CFU/L, B養魚場 1.23×10^6 CFU/L, C養魚場 9.55×10^5 CFU/Lとなった。期間全体を通してA養魚場では他の2養魚場よりも高く, 増減は3養魚場でほぼ同じ動向を示した。

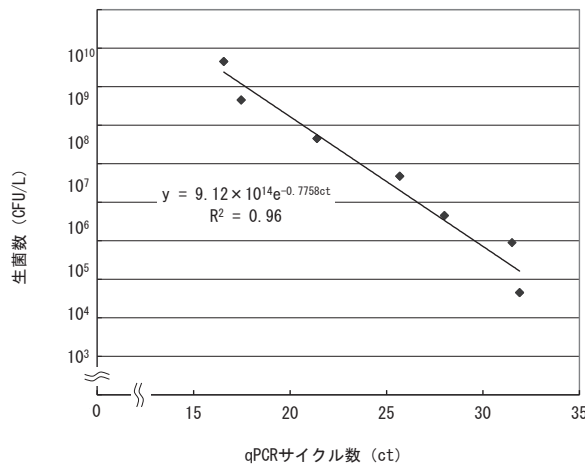


図2 qPCRサイクル数とW.STDの生菌数との相関

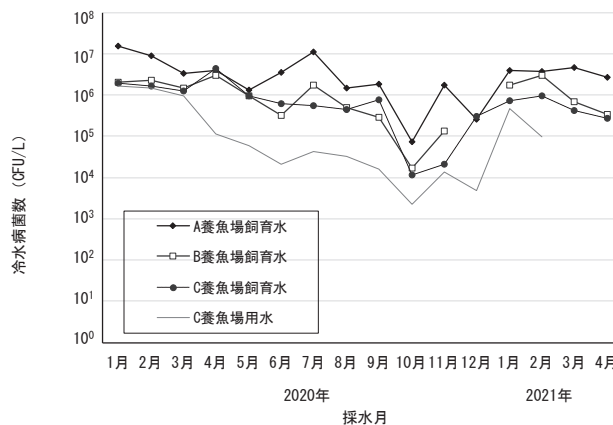


図3 qPCRにより推定した月ごとの養魚場ごとの環境水中の冷水病原菌数

※ B養魚場飼育水12月は検出限界以下
(C養魚場用水の2021年3、4月は欠測)

考察

ニジマス養魚場における用水及び飼育水中の冷水病原菌数

富士山麓の地下水には病原体を含む微生物が極めて少ないとされ¹¹⁾、本研究においても、汲み上げた地下水を用いているB養魚場の用水ではPPIC遺伝子は通年検出限界以下であった。その地下水が湧水となっているA養魚場の用水中においても冷水病原菌は存在していないと考えられる。しかし、A養魚場とB養魚場の飼育水からはPPIC遺伝子がほぼ通年検出され、冷水病原菌が養魚場内に常在していることが示唆された。また、河川水を用水とするC養魚場においても飼育水は常に用水よりも高い数値となっていることから、今回実施した3ヶ所の養魚場内で冷水病原菌が増殖していると考えられる。魚種は異なるものの、アユで冷水病が発生している河川水からは $10^3 \sim 10^5$ copies/LのPPIC遺伝子が検出されたと報告がされている⁷⁾が、本研究で調査したC養魚場の用水から検出されたPPIC遺伝子は最大で 2.86×10^9 copies/Lとなることから、相当量の冷水病原菌が存在していることになる。冷水病原菌は血清型の他、遺伝型による区別もされており^{12, 13)}、由来する魚種により病原性も異なる^{14, 15)}。本研究では調査場所である養魚場内に存在する魚類はニジマスを中心としたサケ科魚類のみであるため、血清型及び遺伝型については検討していないが、アユ由来株がニジマスに高い病原性を示す事例¹⁴⁾も報告されているため、調査の必要性も伺われる。今回推定された3ヶ所の養魚場の飼育水中の菌濃度の平均は $10^5 \sim 10^6$ CFU/Lであったが、ニジマスへの冷水病原菌による人為的な攻撃試験では 10^6 CFU/L以上の菌濃度での浸漬が有効とされている¹⁶⁾。死菌検出等による過大評価の可能性はあるものの、上記の飼育水を用水として再利用する場合には感染源となり、新たな感染を起こすリスクが高い。冷水病の根絶には、清浄な水の確保だけではなく、受精卵の吸水前消毒¹⁷⁾のように感染源を持ち込まない防疫対策に加え、施設内の清浄化による下流域への病原体の排出抑制が必要になると考えられる。

今回、調査月により飼育水の菌濃度は異なったが、水温との関連性はみられなかった。後の聞き取り調査の結果、A, B, C, いずれの養魚場においても冷水病が周年発生しており、飼育水の菌濃度と発生との明確な関連性は見いだせなかった。これには養魚場単位ではなく飼育池を単位とし、死亡率や被害量など発生状況を加えた詳細な調査と解析が必要と考えられる。また、今回

は水量を調査項目としていないため因果関係は不明であるが、飼育水の菌濃度の高かった7月には、当該地域では記録的な大雨があり、湧水量と河川水量が大幅に増加していた¹⁸⁾。冷水病原菌は淡水中で10年以上も生存するという報告¹⁹⁾もあることから、増水により水底に沈んでいた冷水病原菌が流されて一時的に菌濃度が高くなっていった可能性もある。水量も調査項目のひとつとし冷水病原菌の総量を捉えることも飼育魚のモニタリングには必要であることが示唆された。

用水及び飼育水抽出物のqPCRによる冷水病原菌数の定量性

qPCRには絶対定量法と相対定量法があり、細菌数やウイルス量の定量には一般的に絶対定量法が用いられ、既知濃度のコントロールで検量線を作成して定量する²⁰⁾。今回、qPCRの増幅効率の確認にSTDを、用水及び飼育水の菌濃度の定量にW.STDと、2種類のコントロールを用いた。既知コピー数のDNAとしては、組換えプラスミドを用いる方法⁷⁾も報告されているが、作製が容易なPCR産物をSTDとして用いることで簡略化が可能であった。また、今回の解析では既知菌数の水からDNAを抽出したW.STDにより菌数の推定も試みた。本研究で用いたW.STDは対数増殖期の生菌数を基に作製しているためCFU/Lを単位として用いている。W.STDの生菌数とPCRサイクル数の間には有意な相関があり、簡易的な定量法として有効であった。ただし、用水及び飼育水中に多くの死菌が含まれていた場合、死菌DNA由来のPPIC遺伝子を検出してしまうことで、生菌数を過大評価している可能性が考えられる。RNAを鋳型とする手法の報告もあり²¹⁾、より正確に解析が必要な場合にはこれを用いることも検討すべきである。

本研究ではW.STDを用いたqPCRの検出限界を 4.50×10^2 CFU/L以下としたが、ニジマス養魚場の飼育水のモニタリングとして冷水病原菌の定量が可能であった。しかし、用水では検出限界値近い場合もあり、清浄性調査等の用途では感度の向上が必要である。qPCRを阻害する要因のひとつとして、環境水中からDNAを抽出する際に混入するPCR阻害物質があげられる²²⁾。そのため、DNA抽出にQIAmp DNA Mini kit (QUIAGEN)を用いる方法²³⁾や、DNA標準物質を環境水中に加えることで正確に定量する方法²⁴⁾等が報告されているが、いずれの手法も手順が煩雑になる。今回の調査場所は清浄な用水が求められるニジマス養魚場であり供試水中にも懸濁物質等は非常に少ないこと、病原体の増減を捉えるための飼育水のモニタリングでは必然的に検体数が増えることを考慮

すると、本手法のように簡易な手法を用いて解析数を増やした検討を行うのが効果的になると考えられる。

謝辞

用水及び飼育水のサンプリング及びDNAの抽出については、元静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場の木南竜平氏にマニュアルの整備等で協力を頂いた。ここに記して感謝します。

文献

- 1) Davis H.S.(1946): Care and disease of trout. *US department of the Interior Research Report No.12*, US Government Printing Office, Washington, DC. 98pp.
- 2) Wakabayashi H., Toyama T., Iida T.(1994): A study on serotyping of *Cytophaga psychrophila* isolated from fishes in Japan. *Fish Pathology*, **29**(2), 101～104.
- 3) 若林久嗣・堀内三津幸・文谷俊雄(1991): 日本で発生したギンザケ稚魚の冷水病. *魚病研究*, **26**(4), 211～212.
- 4) Izumi S., Wakabayashi H.(1999): Further study on serotyping of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Pathology*, **34**(2), 89～90.
- 5) 熊谷明 (2016): 細菌性冷水病. *魚病研究*, **51**(4), 153～157.
- 6) 辻冴月・遊磨正秀・山中裕樹 (2014): 水域における環境DNA法を用いた生物モニタリング. 里山学研究センター年次報告, 188～191.
- 7) 今城雅之・山崎憲一・山下はづき・門野真弥・片岡榮彦・大崎靖夫・高橋徹 (2017): 高知県鏡川におけるアユ細菌性冷水病の疫学調査. *魚病研究*, **52**(3), 141～151.
- 8) 南隆之・依佐誠・吉田輝豊(2021): プリ類養殖の課題解決へ環境DNAを用いた魚病の早期発見. *養殖ビジネス*, **9**, 37～40.
- 9) 大原健一・景山哲史・桑田知宜・海野徹也・吉澤修一・吉浦康寿(2009): リアルタイムPCRを用いたアユ冷水病魚における*Flavobacterium psychrophilum*の定量性の検討. *日本水産学会誌*, **75**(2), 258～260.
- 10) Rohland N., Reich D. (2012): Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome Res.* **22**(5), 939～946.
- 11) 加藤憲二・永翁一代 (2015): 水循環における微生物DNAインディケーター. *River Front*, **81**, 6～10.
- 12) 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.
- 13) 井上僚・高瀬智洋 (2019): リアルタイムPCRを用いた細菌性冷水病菌原因菌*Flavobacterium psychrophilum*のA,B遺伝子型迅速判別法の開発. *魚病研究*, **54**(3), 58～60.
- 14) 中居祐(2001): アユ及びニジマス由来冷水病原因菌のニジマスに対する病原性. *岐淡水研報*, **46**, 17～21.
- 15) 久下敏宏・新井肇・鈴木究真・泉庄太郎 (2006): ヤマメとニジマスから分離された冷水病菌のアユに対する病原性. *群馬水試研報*, **12**, 28～29.
- 16) 大島俊一郎・近藤基樹・川合研兒 (2004): 魚類冷水病ワクチン. 特開2004-210769
- 17) 熊谷明 (2008): サケ科魚類の細菌性冷水病の垂直感染の防除. *宮城水産研報*, **8**, 49-56.
- 18) 静岡地方气象台 (2020): 静岡県の気象概要2020年年報. 18pp.
- 19) 中居祐・原徹 (2016): 淡水中におけるアユ由来冷水病原因菌の生存性. *岐水研報*, **61**, 17～20.
- 20) 青木仁孝・荒木信夫・珠坪一晃・山口隆司 (2011): Real-time PCR定量に用いるスタンダードDNAの評価. *水環境学会誌*, **34**(2), 41-45.
- 21) Fey A., Eicher S., Flavier S., Christen R., Höfle M. G., Guzmán C. A. (2004): Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism. *Appl Environ Microbiol*, **70**(6), 3618-3623.
- 22) Wilson I.G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 3741-3751.
- 23) Nikaeen M., Makimura K., (2007): Evaluation of QIAamp DNA mini kit for removing of inhibitors in detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples by a nested-PCR assay. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, **4**(2): 241-246.
- 24) 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.

Quantitative monitoring of *Flavobacterium psychrophilum* (Bacterial Cold-water Disease-causing bacteria) in aquatic environments of Rainbow trout farms

Eisuke Nakamura

Abstract The purpose of this study was to monitor the increase and decrease in the number of causative pathogens in aquaculture water to prevent the outbreak of bacterial cold-water disease (BCWD) in rainbow trout farms. In this study, as a basic experiment, we attempted to quantify *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of BCWD, in rearing water by quantitative real-time PCR (qPCR). The experiments were carried out throughout the year in three rainbow trout farms with water from springs, groundwater, and rivers as models. We prepared suspensions of known concentration made with the cultured *F. psychrophilum*, and used a calibration curve generated from the correlation between the number of bacteria and the number of qPCR cycles to estimate the concentration of the bacteria in the rearing water. The estimated mean concentrations of bacteria in the aquaculture water of trout farms were 10^5 — 10^6 CFU/L. The bacteria were detected throughout the year, indicating that the *F. psychrophilum* were endemic to trout farms.

Key words: Bacterial Cold-water Disease, Quantitative PCR, Environmental DNA, Rainbow trout farming, Aquaculture water