

アユにおける細菌性冷水病診断の迅速化と誤診断リスクの低減 ～新しい遺伝子型A、B迅速判別法の開発～			
細菌性冷水病（以下、冷水病）はアユに非常に大きな被害をもたらす疾病であり、当センターでは天然河川や養魚場における蔓延防止に努めています。今回、冷水病菌を迅速に検出し、同時に遺伝子型の判別が可能な手法を開発しました。			
実施機関	振興企画室	事業名	魚病診断と疾病別対策研究

（背景・ねらい）

冷水病はアユやマス類などで問題となっている病気です。特に、アユでは養殖のみならず天然河川でも大きな被害をもたらしています（図1, 2）。冷水病は*Flavobacterium psychrophilum*という細菌の感染によって起こりますが、アユに病原性が高いものと、マス類等に病原性が高いものが存在し、遺伝子配列にわずかな違いがあることが知られています。これを遺伝子型といい、アユ型はA型、マス類他型はB型とされています。アユにおいては、冷水病が陽性と判断されても、B型であった場合には大きな問題とならないため、遺伝子型の判別が蔓延防止や防疫対策の上で重要となります。

遺伝子型判別には、従来PCR-RFLPという手法が用いられていましたが、作業が煩雑であることと検査結果が出るまでに時間がかかることが難点でした。そこで、リアルタイムPCRを用いて迅速に遺伝子型を判別できる手法を開発しました。

（成果の内容・特徴）

① TaqManジェノタイピングを利用した新しい細菌性冷水病診断

従来、冷水病菌の遺伝子型判別を行うには、PCRを行った後に、RFLPという酵素処理を行う、2ステップの検査が必要でした。しかし、今回開発したTaqManジェノタイピングを用いた手法では、1ステップで遺伝子型の判別が可能となりました（図3, 4, 5）。

② 冷水病診断にかかる時間の大幅な削減

従来のPCR-RFLP法では、冷水病菌の検出および遺伝子型判別には8時間程度かかっていましたが、今回開発した手法を用いると、2時間程度で結果を出せるようになりました。これにより、検体を採取した当日中に診断結果を得ることが可能になりました。

③ コンタミネーションリスクの排除による誤診断防止

PCRはごく僅かな菌由来のDNAを大量に増幅し、検出する手法です。従来のPCR-RFLPでは、DNA増幅後の高濃度DNAが入ったチューブを開閉する必要があるため、その後のPCR検査に混入（コンタミネーション）した場合、誤って陽性と判断されてしまう危険があります。今回開発した手法では、PCR後のチューブを開閉することなく結果が得られ、誤診断のリスクが排除されました。

（成果の活用と反映）

冷水病に限らず、魚病は短期間に被害が拡大する場合があります。そのため、対策には迅速な初期対応が非常に重要です。今回開発した手法により、冷水病の検査時間は1/4程度まで減らすことができ、蔓延防止、被害拡大防止の対応を迅速にとることが可能になりました。また、検体数や検査回数を増やすことができるため、感染状況を詳細に把握可能になりました。今後、河川での調査や養殖業者に対する疾病対策等に活用し、引き続き冷水病の蔓延防止に努めていきます。

（井上 僚）

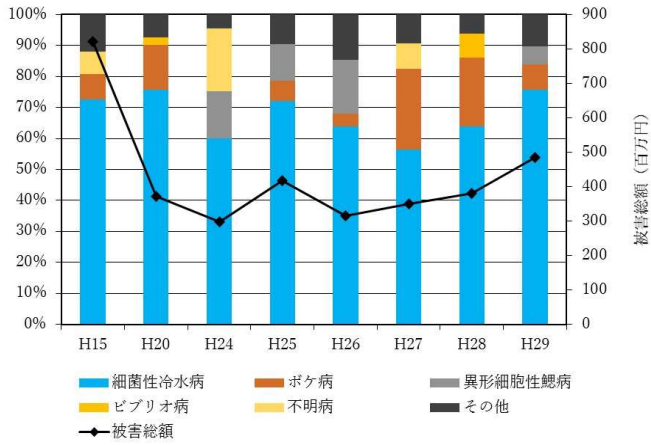


図1 国内におけるアユ疾病被害額上位3位の内訳



図2 細菌性冷水病に罹患したアユ稚魚

上段および中段：下顎に出血、欠損が認められる
下段：体表に潰瘍が認められる

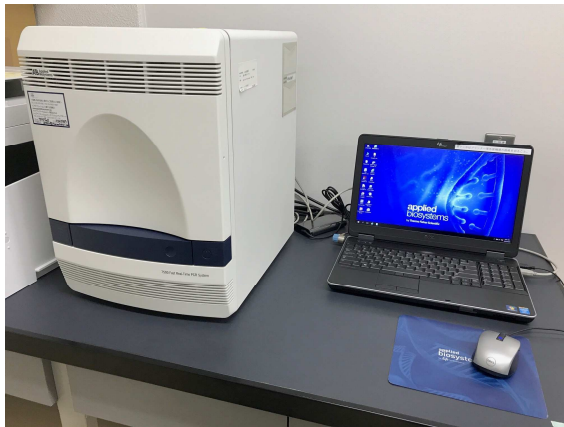


図3 診断に用いるリアルタイムPCR装置

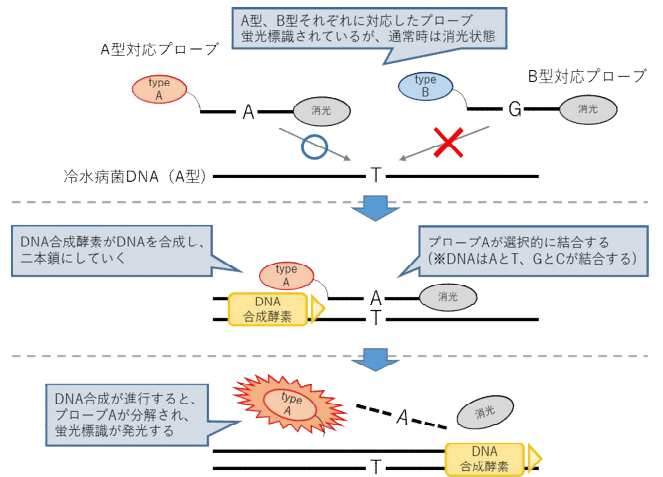


図4 TaqManジェノタイプの原理

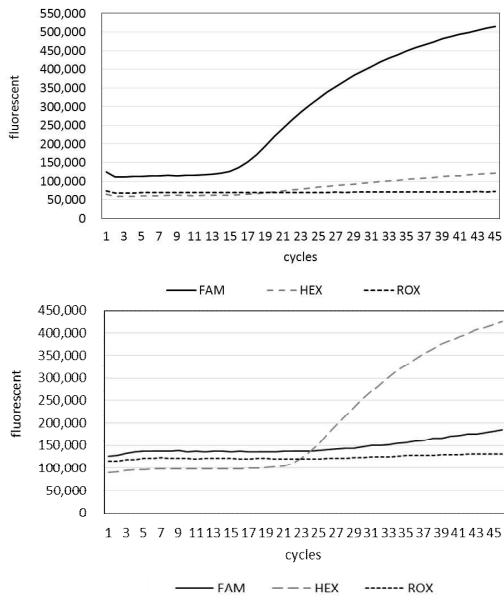


図5 新しく開発したリアルタイムPCR法の結果

左：各遺伝子型に対応した標識の蛍光強度が増幅する

(FAM および HEX はプローブに付加した蛍光標識で、FAM は A 型、HEX は B 型に対応)

右：左のリアルタイムPCRのデータを解析し、図にプロットしたもの

(点線で囲まれた検体が A 型、実線で囲まれた検体が B 型と判断できる)

