

農学部門長 殿

代 表 者 今城 雅之
助言・評価者 大嶋 俊一郎

2017 年度農学部門個人・グループ研究プロジェクト
成 果 報 告 書

標記について、下記のとおり報告いたします。

記

1. プロジェクト名称 環境 DNA 技術を用いた高知県鏡川におけるアユ分布状況のモニタリングと細菌性冷水病原菌 *Flavobacterium psychrophilum* の挙動との関連性に関する研究

2. 研究成果（2 ページ程度）

細菌性冷水病は冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* を原因とし、天然河川において地域振興の役割を担う重要魚種のアユ *Plecoglossus altivelis* で深刻な被害をもたらす細菌性疾病である。鏡川は高知市の中心部を流れる二級中小河川で、市民の川として地元で親しまれ、毎年アユの積極的な放流が実施されている。以前の放流では琵琶湖産稚アユが用いられていたが、高い保菌率から冷水病の蔓延要因とされてきたため、2012 年以降、県産海産人工種苗が放流されるようになっている。しかし、2014 年 6 月下旬に鏡ダム上流の広範囲でアユへい死が起こり、早急に冷水病菌の感染実態を解明する必要性が生じ、これまで冷水病疫学調査を継続して行っている。その中で、鏡川のアユ資源量は、中流域の鏡ダムを境に下流では浦戸湾から遡上する両側回遊型の海産アユ、上流ではダム湖で再生産を繰り返す陸封型のダム湖産アユといずれも天然資源に依存するため大きく変動するが、冷水病発生との関連はまだよく分かっていない。そこで、本研究では、環境 DNA 分析と呼ばれる、生物の在不在や生物量を推定する新しいモニタリング手法を用いて鏡川のアユの生息分布を把握し、併せて細菌性冷水病の疫学調査を行った。

河川水の採水地点は、ダム下流に 7 地点（トリム堰下流に St.1、廓中堰下流に St.2、鏡川堰下流に St.3、江の口鴨田堰下流に St.4、カジヤ下に St.5、鏡庁舎前に St.6、および小川口橋下流に St.7）、ダム上流に 4 地点（天神発電所前に St.8、弘瀬に St.9、桑尾に St.10、および土佐山庁舎前に St.11）を設けた。2017 年 2 月から 12 月まで毎月 1~2 回、各 11 地点の河川水 1 L を採水し、孔径 0.2 μm セルローズ混合エステルメンブレンフィルターでろ過し、フィルター上の集積物から QIAamp DNA Mini Kit で DNA 抽出して環境 DNA 溶液とした。遡上稚アユの採捕は、5 月 1 日と 19 日にダム下流の St.1 で天然海産稚アユを投網により、3 月 3 日、5 月 1 日、5 月 19 日にダム上流の St.8 でダム湖産稚アユを電気ショッカーまたは投網により行った。5 月 22 日以降、アユの採捕方法を友釣りに変更し、採捕地点はダム下流の St.2、St.6、および St.7、ダム上流の St.8 上流（下弘瀬）、St.9、St.10、および St.11 とした。

総採捕数はダム下流で 231 尾、ダム上流で 517 尾であった。採捕アユは体重と体長を測定後、背鰭第 5 条を起点とした側線上方横列鱗数を計数し、アユ由来判別を行った。尚、本研究での判別について、高知県内水面漁業センターの調査結果に基づき、側線上方横列鱗数 15 枚以下を人工放流アユ、16 枚以上をダム上流ではダム湖産アユ、ダム下流では天然海産アユとした。アユを解剖して鰓と腎臓を摘出し、鰓洗浄液濃縮液と腎臓ホモジネート液を作製した。その後、プロテイナーゼ K 溶液によりタンパク消化し、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、鰓・腎臓由来 DNA 溶液を得た。アユ DNA の検出・定量はミトコンドリア DNA の *Cyt b* 遺伝子、冷水病菌 DNA の検出・定量は *PPIC* 遺伝子、または *rpoC* 遺伝子をそれぞれ標的にした既報の TaqMan リアルタイム PCR 法 (今城ら 2017) により、StepOne Plus リアルタイム PCR システムで行った。

側線上方横列鱗数によるダム下流での天然海産アユの割合は、St.2 で 5 月 22 日～11 月 11 日まで 66.7%～100%で推移し、5 月 22 日、6 月 13 日、および 11 月 11 日に 23.1%～33.3%の割合で人工放流アユが混じる形となった。一方、St.6 での天然海産アユの割合は 9 月 25 日に 50%となったものの、5 月 22 日と 6 月 14 日で 18.8%と 38.1%、St.7 では 5 月 22 日～10 月 14 日まで 7.1%～30%で推移し、下流部では天然海産アユ、上流部では人工放流アユが優占して生息することが明らかになった。ダム上流でのダム湖産アユの割合は、5 月 22 日に St.8 上流でのみ 75.0%と他 3 地点と比べて圧倒的に高かったものの、St.9 で 6 月 12 日～9 月 6 日まで 90%～95.5%、St.10 で 7 月 14 日～9 月 7 日まで 67.9%～100%、St.11 で 7 月 12 日～9 月 5 日まで 71.4%～95%となり、期間の経過とともにダム湖産アユの遡上の様子を伺うことができ、ダム上流の広範囲に及ぶ優占的な分布状況が示された。

リアルタイム PCR の結果、St.1 の遡上天然海産稚アユでの陽性率は、5 月 19 日の鰓検体で 7.1%、St.8 の遡上ダム湖産稚アユでは、3 月 3 日の鰓・腎臓検体で 8.3%、5 月 19 日の腎臓検体で 3.2%となり、例年通り、ダム上下流ともに遡上期間の稚アユでの保菌が確認された。天然海産稚アユの場合、ダム下流にある 5 つの堰の魚道を通して遡上するため、降雨による河川水量が重要な遡上要因となり、特に河口側から 2 番目の廓中堰の直下で、4 月から 5 月にかけてアユの集積現象がよく見られるようになる。よって、St.1 の保菌アユが遡上の際に廓中堰直下に一時的に集積することは十分に想定され、同直下がダム下流での感染拡大の場になっていると強く疑われる。ダム上流の友釣りによるアユでの陽性率は、5 月 22 日に St.8 上流の腎臓検体で 5.3%、St.9 の鰓検体で 11.6%、および St.11 の鰓検体で 4.2%、6 月 12 日の St.8 上流の鰓検体で 5%となった。そのうち、5 月 22 日の St.8 上流の陽性検体はダム湖産アユ由来であり、上記の保菌した遡上ダム湖産稚アユに由来によるものと考えられた。一方、残りは全て人工放流アユ由来で、側線上方横列鱗数の結果から推定されたダム湖産アユの遡上状況も考慮すると、5 月に見つかった St.9 と St.11 の保菌アユに関しては、ダム湖産稚アユを感染源としない可能性が高いと判断された。

ダム下流の友釣りによるアユでの陽性率は、5 月 22 日に St.2 の鰓検体で 15%、St.6 の鰓検体で 43.8%、St.7 の鰓検体で 12.5%、6 月 13 日に St.2 の鰓検体で 46.2%と腎臓検体で 38.5%、6 月 14 日に St.6 の鰓検体で 76.2%と腎臓検体で 19.1%、6 月 12 日に St.7 の鰓検体で 14.3%、7 月 20 日に St.2 の腎臓検体で 25%と St.7 の鰓検体で 50%となり、冷水病の発生盛期に各地点で高い陽性率が認められた。中でも、6 月の St.6 で顕著に高い割合となったのは、6 月 14 日に天然河川で初の発生事例となったボケ病による影響によると思われる。また、8 月と 9 月はともに陰性であったものの、10 月 14 日に St.7 の鰓検体で 20%、11 月 11 日に St.2 の鰓検体で 41.7%と腎臓検体で 41.2%となり、産卵場となった St.2 に集積した産卵親アユが高い陽性率を示した。ダム下流における陽性検体の冷水病菌 *PPIC* 遺伝子量は $6.4 \times 10^1 \sim 1.8 \times 10^4$ copies/10 ng 総 DNA となり、死亡魚で見られる 10^4 オーダー以上のコピー数になったの

は、6月14日のSt.6の鰓1検体と11月11日のSt.2の鰓3検体であった。よって、St.2に集積した産卵親アユで冷水病菌が致死魚のレベルにまで増殖していたことも確認できた。これまで、他河川で、産卵場に集積したアユ間で冷水病菌の保菌率の上昇が見られることが報告されており、水温低下と成熟に伴う生体防御効果の低下によるとされている。そのため、鏡川の産卵場においても、産卵親アユに起因する冷水病菌の感染拡大が起きていると推測された。実際に、河川水中の冷水病菌 *rpoC* 遺伝子量も、St.1で10月26日～12月21日に $4.5 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^3$ copies/L、St.8で9月26日～11月27日に $5.0 \times 10^2 \sim 5.1 \times 10^3$ copies/Lと、産卵期にダム上下流の主要産卵場でともに特異的に高くなったことから支持される。アユの産卵は毎年起こる現象であることから、産卵親アユから放出される大量の菌を河川定着の主要因とする仮説を新たに提起し、その詳細について引き続き検討を行っていく予定である。

環境DNA分析の結果、河川水中のアユDNA量は、遡上期間中、ダム下流で4月3日から5月22日までの間、St.1で $2.8 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^6$ copies/L、St.2で $2.6 \times 10^5 \sim 7.3 \times 10^5$ copies/L、St.3で 4.4×10^5 copies/L、ダム上流で5月1日にSt.8で 1.6×10^5 copies/Lと目立って高く、同時期が遡上盛期であったと示唆された。また、遡上に加え、4月16日から6月5日まで計5回の放流もダム上下流で行われており、6月におそらくアユの生息数はピークに達したものと推測できる。その後、各地点のアユDNA量は増加傾向となり定着期に入ったと思われ、7月20日から9月26日の間でピークに達したが、6月20日に、St.1とSt.2では遡上終期、St.5とSt.6では上記で述べたボケ病の被害によるとされる一時的な減少が見られた。ピーク時以降、流下に伴ったアユDNA量の減少傾向の中、ダム下流ではSt.1で10月26日～12月21日まで $1.4 \times 10^6 \sim 3.3 \times 10^6$ copies/L、ダム上流ではSt.8で9月26日に 4.3×10^6 copies/Lと12月21日に 2.1×10^7 copies/L、St.9で12月21日に 4.7×10^6 copies/Lと高値となり、産卵親アユの集積とふ化仔魚の出現によるとされた。潜水調査からもダム上流では9月下旬から、ダム下流では10月中旬からアユの産卵行動が確認されており、それらと一致するものであった。以上の環境DNA分析で示されたアユの生物量の増加の間、河川水中の冷水病菌 *rpoC* 遺伝子量は、ダム下流では減少傾向、ダム上流では増加傾向となった。冷水病菌は 20°C 以上になると、コロニー形成能力を失うとされ、ダム下流では6月20日から総じて同水温を大幅に上回って推移したのに対し、ダム上流では夏場の最高水温でも 22.5°C と下流よりもかなり低く、よって、河川水中の菌の分布は水温の影響をかなり強く受け、一方でアユの生物量にはあまり依存していないと示唆された。

以上から、鏡川における冷水病対策のカギは遡上期と産卵期にあり、現時点で期待できる対策として、冷水病の被害が本格化する前にアユ漁を前倒しで解禁すること、ダム下流の堰を遡上時期に流動的に全倒、または半倒状態にし、スムーズなアユの遡上環境を提供することが挙げられる。

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

本研究は2014年から継続的に冷水病の調査をフィールドで実施している。今回の研究では新たに環境DNAという全く新しい手法で、アユの生息分布ならびに冷水病菌の疫学調査を行っており、この点画期的である。また、この手法を用いた計11ヶ月に及ぶ長期間のフィールド調査により、数々の有益な情報が得られており、これらの情報から具体的な対策まで起案されており非常に有益な研究であると思われる。

今後の課題としては、今回の研究はあくまでも遺伝子断片を対象としており、特に冷水病原菌そのものを分離する手法と合わせて今後解析を継続することで、さらに問題の本質に迫る確度の高い知見が得られ、本病に対する有効な対策の立案につながるものと期待される。

4. 研究成果公開実績

1. 山下はづき・加藤佑亮・門野真弥・長岩理央・占部敦史・大崎靖夫・片岡榮彦・今城雅之 (2017) 高知県二級河川鏡川のダム上流におけるアユ細菌性冷水病の疫学調査研究. 平成 29 年度日本水産学会中国・四国支部例会.
2. 山下はづき (2018) 高知県鏡川のアユを対象とした環境DNA分析による生息分布推定および細菌性冷水病の疫学調査. 第45回四国魚類研究会.