

農学部門長 殿

代 表 者 今城 雅之
助言・評価者 大嶋 俊一郎

平成 30 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 高知県四万十川におけるアユ環境 DNA の経時的網羅的解析、ならびにそれに伴う冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング

2. 研究成果（2 ページ程度）

高知県西部に位置する四万十川において、アユは古くから最も重要な漁業対象魚種であり、その漁獲量は 1980 年代初頭には 1,000 t 以上を記録し、かつて全国有数の水準を誇ったが、1990 年代以降著しく低迷した状態が続いている。その要因の一つに、冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌性冷水病（以下、冷水病）の蔓延が挙げられる。本病の最も発生しやすい時期は、現場での経験則と水温の観点から主に 5 月とされているが、インフルエンザのような実際の罹患率の推移に基づいたものではなく、そのため、詳細がよく分からず、対策を行うべき場所や時期を適切に判断できない状況にある。そこで、本研究では、4 月下旬から 12 月中旬まで、四万十川中流域から下流域のアユ生物量を環境 DNA 分析と呼ばれる新しい技術を用いて解析し、併せて河川水の冷水病菌量との相関性を指標にすることで、冷水病流行レベルを推定した。また、最大の流行レベルにあった場所のアユを対象に感染拡大実態も調査して根拠を示した。

採水地点は、本川上流から第一三島沈下橋直下流に St. 1、道の駅四万十とおわ前に St. 2、長生沈下橋直下流に St. 3、本川・広見川合流地点下流に St. 4、津大橋下流に St. 5、岩間大橋下流に St. 6、口屋内沈下橋下流に St. 7、勝間沈下橋直下流に St. 8、佐田沈下橋直上流に St. 9、および赤鉄橋橋上流に St. 10 を設け、支流から目黒川小津賀沈下橋直下流に St. 11 と黒尊川下流に St. 12 を設けた。採水日は 4/23、5/31、6/20、7/18、8/14、9/19、10/23、11/19、および 12/14 とした。

採水を開始した 4/23 は全 12 地点でアユ cyt b 遺伝子が 7,268~109,261 copies/L の範囲で検出され、最上流の St. 1 が最高値を示し、中流域までの稚アユの遡上状況を反映したものと考えられた。その後、同遺伝子量は St. 5 上流の本川 5 地点と支流 2 地点で緩やかに増加し、7/18 または 8/14 のいずれかでピークに達した。一方、その間に St. 6 下流の本川 5 地点では大きな変動量が見られず、アユはかなりいるがサイズが小さいとの St. 7 での聞き取り調査から、アユの生息数ではなく、成長不良によると考えられた。6/20 は大雨による重度の濁水の影響で適切な結果を得ることができなかった。

冷水病菌 rpoC 遺伝子はシングルコピー遺伝子で、同遺伝子量はそのまま推定菌数となる。上記期間中の rpoC 遺伝子の検出地点数と量は、4/23 に 6 地点で 563~5,534 copies/L、5/31 に 7 地点で 589~6,961 copies/L となり、支流の St. 11 と St. 12 で高値を示した。一方、6/20~9/19 の間、まず、6/20 に 1 地点で 743 copies/L、7/18 に 2 地点で 534~590 copies/L と検出地点数が大幅に減少し、次に、8/14 に 7 地点で 421~1,918 copies/L、9/19 に 9 地点で 480~1,502 copies/L と再び検出地点数は多くなったものの、遺伝子量は一貫して増加しなかった。よって、これらから、遡上期と定着期での河川水中の冷水病菌量はアユ生物量ではなく水温に依存することが分かった。この理由として、まず、河川水中の冷水病菌はおそらく感染アユから排菌されたもので、23°C以上で発育可能温度の上限を超えるため、6/20 以降は宿主内での増殖が高水温で抑制されていたと想定した。次に、冷水病菌は環境水等の飢餓条件では増殖できず、22~27°Cで2~7日以内、28°Cで2日以内にコロニー形成能を失うことも挙げられた。

9/19 以降のアユ cyt b 遺伝子量は St. 5 より上流の 6 地点で減少傾向となり、流下行動によると思われる。その中で、9/19 に St. 4、10/23 には加えて St. 5 でも目立って高値となり、本川と支流の合流付近での一時的な流下親アユの集積現象が示唆された。また、10/23 以降、冷水病菌 rpoC 遺伝子量はアユ cyt b 遺伝子量と増減推移が概ね一致しており、特に 10/23 に St. 4 で 7,662 copies/L、St. 7 で 7,692 copies/L、および St. 11 で 8,987 copies/L、11/19 に St. 9 で 9,040 copies/L と St. 10 で 321,236 copies/L、12/14 に St. 9 で 7,453 copies/L と St. 10 で 128,857 copies/L とこれまでにない高値が示された。この増加傾向に転じた要因に次の 2 つが挙げられる。1 つ目は水温で、9/19 の 20.1~24.0°C から 10/23 の 16.1~18.9°C と冷水病菌の至適水温まで低下した状況にあった。2 つ目は親アユの非特異免疫能で、冷水病菌に対する体腎白血球の貪食活性と血清殺菌活性が性成熟に伴って低下すると報告されている。よって、河川水中の冷水病菌量は、流下時期になると遡上期や定着期と違い、菌が増殖しやすい親アユからの排菌によるようになり、水温からアユ生物量の依存に変わると考えられた。

St. 10 は毎年大規模な産卵場が形成される地点で、11/19 にアユ cyt b 遺伝子量が 2,876,491 copies/L、冷水病菌 rpoC 遺伝子が 321,236 copies/L とともに年間の最高値となり、冷水病流行レベルは産卵期に St. 10 で最大になると推定された。さらに St. 10 の親アユ鰓検体での冷水病菌 PPIC 遺伝子の陽性率と量は、10/29 の 115 検体で 5.2% と 23~606 copies/100 ng 総 DNA、11/5 の 99 検体で 7.1% と 26~3,667 copies/100 ng 総 DNA、11/26 の 100 検体で 100% と 59~413,988 copies/100 ng 総 DNA と産卵時期後半に急上昇しており、冷水病菌が St. 10 の親アユ間で急速に感染拡大している証拠を得た。

11/11~11/27 に計 6 回収した死亡アユから、次のように高率・高量で冷水病菌 PPIC 遺伝子が検出

された。11/11 の 9 検体から鰓で 100% の 2,833~26,309 copies/100 ng 総 DNA と腎臓で 77.8% の 115~5,453 copies /100 ng 総 DNA、11/13 の 29 検体から鰓で 100% の 437~60,368 copies /100 ng 総 DNA と腎臓で 93.1% の 120~15,082 copies /100 ng 総 DNA、11/18 の 49 検体から鰓で 100% の 80~133,644 copies /100 ng 総 DNA と腎臓で 100% の 37~8,824 copies /100 ng 総 DNA、11/20 の 50 検体から鰓で 100% の 135~62,431 copies /100 ng 総 DNA と腎臓で 100% の 45~45,547 copies /100 ng 総 DNA、11/25 の 50 検体から鰓で 100% の 394~310,510 copies /100 ng 総 DNA と腎臓で 100% の 260~19,832 copies /100 ng 総 DNA、11/27 の 50 検体から鰓で 100% の 2,029~413,988 copies /100 ng 総 DNA と腎臓で 100% の 190~100,099 copies /100 ng 総 DNA。よって、St. 10 の親アユに流行する冷水病の感染源は死亡アユで、そこから大量に排菌されている可能性が強く示唆された。

死亡アユからの菌分離陽性率は腐敗程度に大きく左右され、次のように回収日間でバラツキが生じた。11/11 の 9 検体から鰓で 44.4% と腎臓で 55.6%、11/13 の 29 検体から鰓で 72.4% と腎臓で 82.8%、11/18 の 49 検体から鰓で 51% と腎臓で 59.2%、11/20 の 50 検体から鰓で 72% と腎臓で 86%、11/25 の 50 検体から鰓で 48% と腎臓で 70%、11/27 の 50 検体から鰓で 20% と腎臓で 36%。これら分離株の遺伝子型は、A/GC 型、A/AC 型、A/AT 型、または B/AC 型のいずれかに判別され、11/11 の鰓・腎臓分離株全てで A/GC 型、11/13 の鰓分離株の 95.2% で A/GC 型、4.8% で A/AC 型、腎臓分離株の 75% で A/GC 型、20.8% で A/AC 型、および 4.2% で A/AT 型、11/18 の鰓分離株の 68% で A/GC 型、24% で A/AC 型、および 8% で B/AC 型、腎臓分離株の 79.3% で A/GC 型、13.8% で A/AC 型、および 6.9% で A/AT 型、11/20 の鰓分離株の 77.8% で A/GC 型、19.4% で A/AC 型、および 2.8% で B/AC 型、腎臓分離株の 86% で A/GC 型、11.6% で A/AC 型、および 2.3% で A/AT 型、11/25 の鰓分離株の 58.3% で A/GC 型、33.3% で A/AC 型、および 8.3% で B/AC 型、腎臓分離株の 74.3% で A/GC 型、8.6% で A/AC 型、2.9% で A/AT 型、および 14.3% で B/AC 型、11/27 の鰓分離株の 40% で A/GC 型、50% で A/AC 型、および 10% で B/AC 型、腎臓分離株の 55.6% で A/GC 型、16.7% で A/AC 型、5.6% で A/AT 型、および 22.2% で B/AC 型。これらから、死亡アユでは高病原性タイプ A/G-C 型が優先的に検出されたが、他タイプの感染も見られ、四万十川のアユはもしかすると違った時期や場所で複数回の感染を経験しているのかもしれない。

以上をまとめると、四万十川中・下流域において、冷水病流行レベルは 11 月の産卵期に赤鉄橋上流付近の産卵場で最大となり、産卵親アユ間の冷水病蔓延で本来の産卵活動の低下リスクを招いている懸念が見つかり、翌年の資源量に悪影響を及ぼすことを指摘するものであった。

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

河川域でのアユの冷水病の発生の予測は、これまで経験則である暗黙知によって行われているようである。このような背景のもと、本研究では環境 DNA 分析の手法を応用し、科学的根拠に基づいた実効性のある本病発生の時期や場所を明らかにしようとするもので、今後の本病の効果的な対策に大きな貢献をすることが十分に期待できる。

本研究で実施された持続的な現場調査から、一概に冷水病原菌の菌量はアユの生物量に依存するのではなく、水温に依存していることを明らかにした。さらに、冷水病の主要な感染源は死亡アユからの大量の排菌がその主因であることも突き止めている。このように本研究では、本病発症に

至る各要素の関係性を解明しており、アカデミックにも価値のある知見を得ている。

今後も継続的にこのような調査を実施していただき、今回得ている知見の再現性をしっかり確認し、より確度の高い本病の発生に至るメカニズムを解明されることを期待します。

4. 研究成果の公開実績・予定

口頭発表

1. 山下はづき・辻祐人・高木基裕・山田裕貴・門野真弥・堀岡喜久雄・大木正行・今城雅之「環境DNA分析による高知県四万十川のアユ分布状況の把握と冷水病菌分布との相関について」平成30年度日本魚病学会秋季大会 広島大学東広島キャンパス 2018年9月
2. 山田裕貴・今城雅之・山下はづき・堀岡喜久雄・大木正行・辻祐人・高木基裕「DNAマーカーによる四万十川放流アユ種苗の識別と繁殖貢献の有無」平成30年度日本水産学会秋季大会 広島大学東広島キャンパス 2018年9月

講演

1. 今城雅之・山下はづき「四万十川が抱えるアユ冷水病問題の課題は何か？調査研究から見えてきたこと」四万十川流域での産業振興と環境との調和に関する研修会次第 四万十市立中央公民館 2019年2月