

農学部門長 殿

代 表 者 今城 雅之
助言・評価者 大島 俊一郎

令和元年度農学部門個人・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 稚アユの遡上期における高知県鏡川下流各堰での冷水病菌感染リスクの評価

2. 研究成果（2 ページ程度）

アユ (*Plecoglossus altivelis*) の友釣りは人気の高い遊漁であり、河川によってはその遊漁料収入が財源の大きな柱となる。高知市中心部を流れる鏡川では、天然アユ資源の減少を背景に、毎年、高知県内水面種苗センターの生産する海産人工種苗「土佐のあゆ」が積極的に放流されている。また、高知市行政の取り組みとして、2017 年に鏡川清流保全基本計画が策定され、「地域特性を踏まえた水質の監視」、「源流域の重要性とその保全のしくみづくり」、「鏡川の魅力を伝える人材育成と環境学習の多様な展開」からなる 3 項目を重要ポイントに掲げ、清流のシンボルであるアユの資源増大を目指して、産卵場の維持・拡大、陸封アユの生息状況の把握等が行われている。しかしその一方で、フラボバクテリウム・サイクロフィラムを原因とする細菌性冷水病（以下、冷水病）の発生も依然大きな課題となっており、これまでその対策の検討に必要となるデータや知見等を収集してきた。

鏡川下流の 9.5 km 間には、河口側からトリム堰、廓中堰、鏡川堰、江の口鴨田堰、および朝倉堰が連続的に設置され、各堰に設けられた魚道の劣化でアユの移動障害が起き、遡上期には堰直下で稚アユが留まる集積現象が発生するとして、特に廓中堰が問題視されている。そこで今回は、これらの堰がアユの健全な生息に悪影響を及ぼしている事柄を踏まえ、アユ集積が冷水病の感染拡大のリスク要因に関わるとの仮説を立てて、その詳細について検討した。

手順の概要は下記に示す。河口側から上流に向かって新月橋直下流に St. A、トリム堰直上に St. B、廓中堰直上に St. C、朝倉堰直上に St. D の計 4 地点（下図右地図参照）を設けて、遡上時期を主に 3 月 4 日から 6 月 25 日まで週 4~5 回の頻度で河川水 1 L を採水した。その際、YSI55 型 DO メーター（ワイエスアイナノテック社製）を用いて水温も測定した。河川水 1 L をセルロース混合エステルメンブ

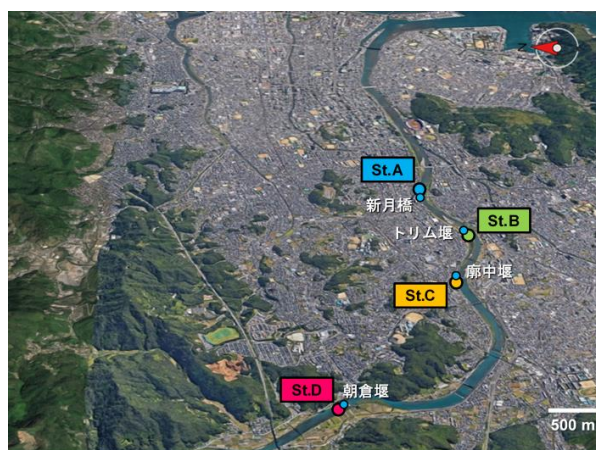
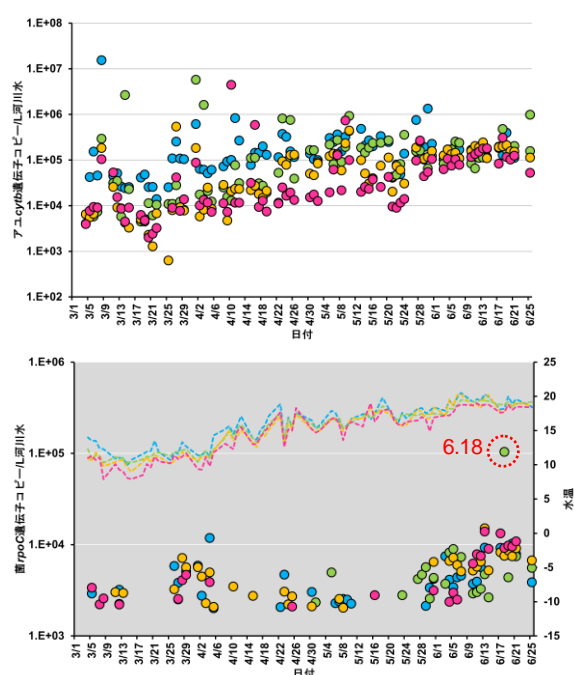
レンフィルター（孔径 0.2 μm, アドバンテック社製）でろ過し、フィルター付着物から QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社製）を用いて DNA 抽出を行った。得られた DNA 溶液の DNA 純度と収量を Q5000 微量紫外可視分光光度計（トミー精工社製）で確認した。リアルタイム PCR は、冷水病菌検出のため、Strepparava *et al.* (2014, BMC Microbiol.) が報告したプライマーとプローブセットを用いて、β' DNA-dependent RNA polymerase (*rpoC*) 遺伝子を、アユ検出のため、Yamanaka & Minamoto (2016, Ecol. Indic.) が報告したプライマーとプローブセットを用いて、mitochondrial cytochrome b (*cytb*) 遺伝子をそれぞれ標的にした。PCR 反応には、TaqMan Real-Time PCR Master Mix（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）と QuantStudio 5 リアルタイム PCR システム（ライフテクノロジーズ社製）を用いた。アユ *cytb* 遺伝子と菌 *rpoC* 遺伝子のコピー数は、得られた Ct 値から今城ら (2017, 魚病研究) に準じた検量線で算出した。



リアルタイム PCR の結果は下図左に示す。2019 年の天然稚アユの遡上量は例年に比べて少なかったとの見解があり、地点間差でアユ *cytb* 遺伝子のコピー数が相対的に高かったのは、3 月 8 日の St. A で 1.5×10^7 copies/L、14 日の St. B で 2.7×10^6 copies/L、4 月 1 日と 3 日の St. B で 5.8×10^6 copies/L と 1.6×10^6 copies/L、10 日の St. D で 4.5×10^6 copies/L であった。このことは、おそらく大量の遡上稚アユの群れと、3 月 24 日と 31 日に放流された人工稚アユの影響を反映したと考えられた。5 月に比べ、6 月に入るとアユ *cytb* 遺伝子の目立った地点間差がなくなり、生息数のピークを迎えたと推測され、5 月 21 日に最後の放流が行われたことと、毎年 5 月下旬を天然稚アユの遡上盛期とする例年の傾向とも一致した。上記に述べたアユ *cytb* 遺伝子量の推移の中で、もうひとつ注目すべきは、菌 *rpoC* 遺伝子との関連性である。河川水中から検出される冷水病菌は感染アユから排菌されたものであり、その排菌量は死亡前よりも死亡後のアユの方が多いと報告されている (大原ら 2010, 日本水産学会誌)。各月の菌 *rpoC* 遺伝子の検出頻度を比較すると、6 月が最も高く、アユ *cytb* 遺伝子から推定されるアユ生物量に依存した結果となり、中でも 6 月 18 日の St. B で 1.0×10^5 copies/L と期間中唯一の 10^5 オーダーの最高値が示された。また、6 月の水温推移を見ると、冷水病菌の培養温度は $15 \sim 18^\circ\text{C}$ であることと、冷水病の好発水温帯は $16 \sim 20^\circ\text{C}$ とされることとも密接に関係していたと思われ、これらのことから、アユの保菌率は生息数とともに高まっていき、感染アユからの排菌は増殖を伴う必要があ

るために水温の影響を強く受けると示唆された。

以上、鏡川下流のいずれの環境水からも冷水病菌が検出されたことに鑑みると、遡上期には既にトリム堰と廓中堰の周辺に感染稚アユが生息していたことは間違いなく、さらにトリム堰直上で6月18日に高い菌量が検出されたのは感染拡大の兆候であった可能性がある。また、今回データには示していないが、2018年には4月に同地点で同様の傾向を確認している。もし仮に、トリム堰と廓中堰間の約800 mが冷水病の感染拡大の温床となると仮定すれば、廓中堰直下で頻発するアユ集積がそのリスクをさらに高めることも懸念される。そのため、廓中堰を遡上時期のタイミングに合わせて全倒状態にすることで、スムーズにアユが遡上できる環境を整備することが有効な冷水病対策になると考え、この可能性について今後さらに検証していく予定である。



左は各4地点におけるアユ *cytb* 遺伝子 (上図) と菌 *rpoC* 遺伝子 (下図) の推移を示す。両図のシンボルはコピー数、下図の破線は水温をそれぞれ表す。右は各4地点の位置を示す。

3. 研究助言・評価者のコメント (300字程度)

本研究は、現場を対象にして4か月におよぶ地道な調査に基づき得られた研究成果であり、特定の領域とはいえ実効性のある対策を立ち上げる上で価値の高い情報が得られていると思われる。具体的には、アユの生物量と冷水病原菌の検出システムを基盤に、現場で予測されている魚道の劣化に伴うアユの集積が冷水病の感染拡大のリスクになる可能性について検討し、高いレベルでこの仮説の確度について検証できている。

今後は、1) 今回の採水地点より、上流でも採水する(本病原菌の存在のノイズを除く)、2) 現在1Lを採水しているが、もっと少量で評価できるシステムの検討(更に多くの地点でのデータが集積でき信頼度が上がる)、3) アユ以外の他生物との関係性などについて検討することを勧めます。

4. 研究成果の公開実績・予定

学会発表

小川晴暉・山下はづき・高橋徹・片岡榮彦・大崎靖夫・今城雅之 高知県鏡川下流堰の遡上アユにおける細菌性冷水病菌感染拡大のリスク評価. 令和元年度日本水産学会中国・四国支部例会. 2019年10月26日

学術論文

Yamashita H., Wada T., Kato Y., Ikeda T. Imajoh M. (2019) Draft genome sequences of three *Flavobacterium psychrophilum* strains isolated from diseased ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) caught at three sites in the Kagami River in Kochi, Japan. *Microbiol. Resour. Announc.*, 8(34), e00773-19.