

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 2 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 リアルタイム PCR による河川水中の冷水病菌定量的検出に基づいたアユ細菌性冷水病の流行予測－高知県物部川下流域をモデルケースとして－

2. 研究成果（2 ページ程度）

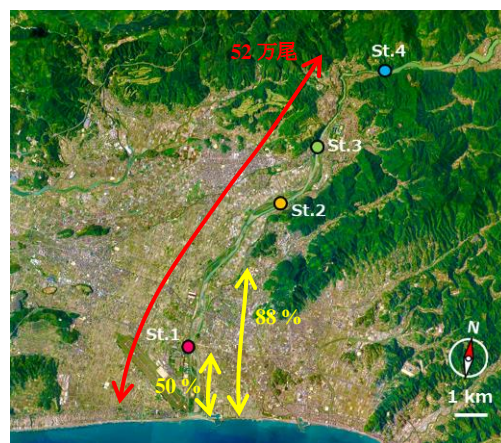
日本全国の河川において、アユ (*Plecoglossus altivelis*) の友釣りは人気の高い遊漁である。高知県一級河川の物部川では、アユ資源を土佐湾からの遡上アユのみで賄う特別区が下流域に設けられ、「天然アユが生息する河川」として県内外の遊漁者に高い人気を誇る。同エリアのアユ漁解禁日は 5 月 15 日となるが、フラボバクテリウム・サイクロフィラムを原因とする細菌性冷水病（以下、冷水病）の流行時期でもあるため、毎年、本疾病の蔓延によるアユ釣果への悪影響が危惧されるものの、その実態は明らかでない。そこで本研究では、qPCR を用いて検出される河川水のアユ環境 DNA 濃度とフラボバクテリウム・サイクロフィラム DNA 濃度に基づき、物部川下流のアユにおける冷水病流行の予測を行った。



物部川下流域のアユ解禁日当日の風景。
20 年 5 月 15 日に撮影。

手順は次の通りである。河口側から上流に向かって人工産卵場上流に St.1、町田堰直下に St.2、合同堰下流に St.3、杉田ダム直上に St.4 の計 4 地点 (Fig. 1 上地図参照) を設けて、稚アユの遡上期を含めて 3 月 16 日から 6 月 30 日まで週 5 回と、8 月 20 日に河川水 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 をセルローズ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。qPCR は、フラボバクテリウム・サイクロフィラム検出のため、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* 遺伝子とフラボバクテリウム・サイクロフィラム *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。



St.1 人工産卵場上流



St.2 町田堰直下



St.3 合同堰下流



St.4 杉田ダム直上

Fig. 1. 物部川下流域における採水4地点の位置。

4月11日と12日に実施された西日本科学技術研究所の潜水調査によると、河口から St.3 の間で、推定された4月中旬の総アユ生息尾数は約52万尾であり、そのうち、河口から St.1 までで全体の50%、Sts.1-2 間にある深淵床止まになると88%のアユが生息していたと報告されている。qPCRによるアユ環境DNA濃度の推移結果を Fig. 2 左に示した。このアユ環境DNA濃度は、採水地点のアユ生物量、つまり、個体数や現存量の大小を相対的に評価でき、通常の出検範囲は採水地点から上流に400~800 m とされている (赤松ら, 2017, 土木学会論文集 B1)。4月11日と12日のデータはないが、翌日の13日の同濃度において、St.1 は 2.2×10^5 copies/L、St.2 は 9.3×10^2 copies/L、St.3 は 4.8×10^2 copies/L、St.4

は 1.0×10^3 copies/L となり、上記の推定生息数と相対的に一致した値が得られ、データの信頼度の高さが証明された。そうした背景のもと、4 地点のうち、St.1 のアユ環境 DNA 濃度が、期間中のほとんどで最も高値に検出される傾向にあり、アユ生息の優占性を反映したと考えられた。また各月毎で見ると、アユ環境 DNA 濃度の地点差は 6 月に最も少なくなり、生物量のピークを迎えた。その後、8 月 20 日に、St.1 が 7.9×10^4 copies/L、St.2 が 1.3×10^4 copies/L、St.3 が 8.9×10^3 copies/L、St.4 が 2.5×10^3 copies/L となり、St.2 から上流のアユ資源がかなり減耗している様子を伺うことができた。こうしたアユ環境 DNA 濃度推移の中で、今回注目すべきは、菌 DNA 検出との関連性である。河川水に分布するフラボバクテリウム・サイクロフィラムは、感染アユから排菌されたもので、qPCR の標的遺伝子 1 copy につき菌数を 1 と考えることができる。菌 DNA 濃度の推移結果を Fig. 2 右に示した。菌 DNA は St.1 で最も高頻度に検出され、最優占地点のアユでの保菌率の高さが示唆された。また、4 月下旬から 6 月上旬までほとんどが 10^3 オーダー以上の高濃度で推移しており、そのうち、4 月 24 日に 2.1×10^4 copies/L、5 月 11 日に 6.9×10^3 copies/L、5 月 29 日に 7.1×10^3 copies/L の 3 回ピークが見られ、6 月に入ると濃度は大幅に減少し、引き続き 8 月 20 日に検出限界以下となった。この推移は、冷水病流行の一部始終を初めて捉えたものと考え、その根拠としてさらに、感染アユからの排菌は増殖を伴うために健常アユよりも罹患アユや死亡アユで多くなることと、実際 5 月 15 日の解禁後に冷水病の影響と思われる釣果不良が起きていたとの関係者の私談と一致していたことから支持された。よって、本研究の手法は、遊漁者にアユ釣果の良し悪しに関する有益な情報を提供できる可能性が期待されるものである。

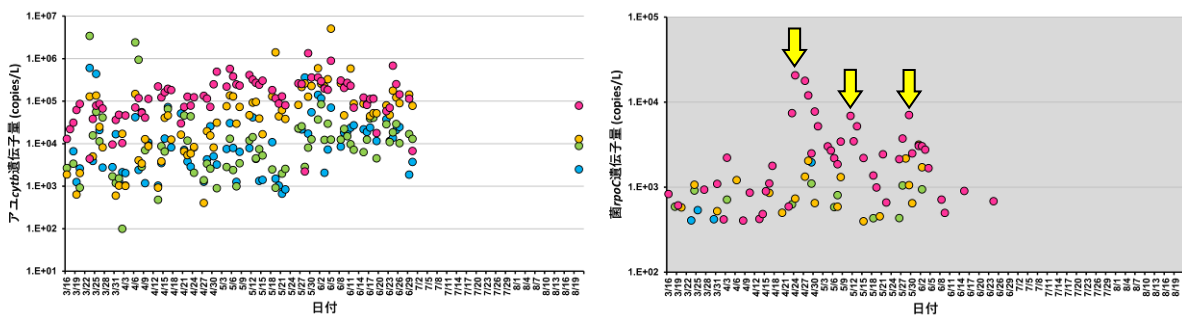


Fig. 2. qPCR で検出された 4 地点のアユ環境 DNA 濃度 (左) と菌 DNA 濃度 (右) の推移。
各地点のシンボルカラーは Fig. 1 と同じ。

3. 研究助言・評価者のコメント (300 字程度)

本研究は、高知県でも産業的に重要なアユ資源に例年悪影響を及ぼす冷水病の実態把握を目的としているが、これはこれまでに重要課題でありながら難しいとされてきた。

本研究では、地道な現場調査によってアユの環境 DNA 濃度に基づいた生息数の推定が可能であることを明らかにした。また冷水病原菌由来 DNA の定量システムを用いて、アユの生物量と菌 DNA の関連性を調べ、冷水病流行期のこれらの実態把握を初めて可能にしたものであり、価値ある研究であると考えられる。

今後はこのシステムを用いて、天然河川で発生する冷水病の実態解明を継続的に実施し、より確度の高い実態把握の実現と冷水病の効果的な防疫対策に繋げて欲しいと考える。

4. 研究成果の公開実績・予定

令和2年度物部川アユ冷水病調査報告会 物部川漁業協同組合事務所 3月5日