

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 28 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 高知県二級河川鏡川における細菌性冷水病の原因菌 *Flavobacterium psychrophilum* の分布動態の解明

2. 研究成果（2 ページ程度）

鏡川は高知市街地を貫流し浦戸湾に続く延長 31.1 km、流域面積 170 km²の二級中小河川で、平成の名水百選に選定された市民の川として地元で親しまれている。鏡川では地域振興の役割を担うアユ資源を毎年放流で支えており、本川中流の鏡大利にある鏡ダムを境に下流には浦戸湾から遡上する天然アユと放流アユ、上流には陸封アユと放流アユが生息するようになる。この陸封アユは鏡ダム湖で育ち、平均推定生息尾数は 2010 年から 2014 年まで約 10 万尾で推移し非常に豊富であることから、鏡川の貴重なアユ資源として期待されている。細菌性冷水病は *Flavobacterium psychrophilum* を原因としアユで最も被害の大きい疾病である。鏡川ではかつて琵琶湖産稚アユを主に放流していたが、本菌の保菌率が高く、放流アユが感染源となり冷水病を蔓延させる要因であったため、対策として 2012 年から高知県内産の海産人工種苗に切り替えて放流が行われるようになった。しかし、2014 年 6 月下旬に鏡ダム上流の広範囲でアユの大量へい死が発生し、同対策は不十分であると判明したことから、早急にアユ冷水病の感染実態を詳細に把握する必要性が高まり、これまでに 2 年間疫学調査を実施してきた。その一つの成果として、各分野の有識者で構成される鏡川水系環境保全対策協議会で作成した鏡川水系環境保全対策に関する提言書の中に、冷水病の発生盛期前にアユ解禁日を前倒しすることで本疾病によるアユの減耗軽減と本疾病の感染拡大抑制の 2 点を図る内容を盛り込み 2016 年 9 月に県と市に提言した。本研究では、陸封アユの継続的な生息が確認され注目されている鏡ダム上流本川のアユを対象に継続して冷水病の疫学調査を実施した。

調査地点は、陸封アユの主要産卵場の天神発電所前、友釣りの良好な場所の 3 地点、すなわち弘瀬、桑尾、土佐山庁舎前の計 4 地点とした。アユの採捕は 5 月 23 日から 10 月 31 日まで友釣りまたは投網で行い、総採捕数は 327 尾であった。また、6 月 2 日から 12 月 20 日まで各 4 地点の河川水 1 L を採水した。採捕アユは体重と体長を測定後、側線上方横列鱗数を計数した。解剖で鰓と腎臓を摘出し、

両組織から改変サイトファーガ寒天培地を用いた菌分離とフェノール・クロロホルム法による DNA 抽出を行った。河川水 1 L は 0.22 μm ポアサイズのフィルターでろ過し、同フィルター上の捕集試料から QIAamp DNA Mini kit を用いて DNA 抽出した。*F. psychrophilum* の検出・定量は大原ら (2009) のプライマーセットを用いて、ロタマーゼ遺伝子群の 1 つである peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子領域を標的としたリアルタイム PCR 法で行った。*F. psychrophilum* の遺伝子型の解析は吉浦ら (2006) の *Hinf*I 断片長解析と Fujiwara-Nagata ら (2012) の on/off スイッチアッセイで判別した。

アユの由来判別は西日本科学技術研究所の以前の報告に基づき、側線上方横列鱗数が 18 枚以上のものを陸封アユ、17 枚以下を放流アユとした。天神発電所前では 5 月 23 日の採捕アユは全て陸封アユとなったが、6 月 6 日にその割合は 40 % まで低下しており、おそらく同地点の上流に位置する弘瀬で 5 月 23 日に放流された推定 3,000 尾の海産人工稚アユの移動によると考えられた。また、6 月 6 日～9 月 13 日まで弘瀬で 9～57.1 %、桑尾で 26.7～57.1 %、土佐山庁舎前で 20～29.4 % の割合で陸封アユが分布していたことから、鏡ダム湖産の陸封アユはアユ漁法制限区の上流まで遡上しているのが確認され、上流の土佐山庁舎前では放流アユの方が優先して生息する傾向が示された。

リアルタイム PCR による *F. psychrophilum* の検出・定量の結果、6 月 6 日～7 月 25 日まで弘瀬で 6.3～13.3 %、桑尾で 6.7～28.6 %、土佐山庁舎前で 4.8～16.7 % といずれも陽性率は低率で推移し、かつコピー数の増加もないまま、8 月 30 日と 9 月 13 日の採捕アユは全て陰性となった。アユはストレス反応が進行すると、免疫機能が低下して冷水病などの疾病に罹りやすい状態になる。2014 年 6 月下旬に発生したアユの大量へい死時、直前の 6 月 22 日に梅雨時期特有の大雨が降り、重度の濁水が広範囲で確認されている。アユにとって濁水はストレスャーとして作用し、濁度と暴露時間に依存して血中のコルチゾール濃度が上昇することが報告されていることから、当時はアユが強い濁水ストレスを受けたため集団で冷水病発症をもたらしたと思われ、今回の調査期間中で冷水病発生盛期の 6 月から 7 月に弘瀬、桑尾、土佐山庁舎前で目立った冷水病被害がなかったことは、アユのストレスャー要因がなかったためと推察された。

天神発電所前での *F. psychrophilum* 陽性率は 5 月 23 日と 6 月 6 日で低かったのに対し、10 月 12 日と 10 月 31 日の採捕アユは全て陽性となり、かつ鰓検体で 10^2 から 10^6 オーダーと一部で高いコピー数が示された。このことから、本菌が産卵期に感染拡大していることが初めて明らかとなり、産卵ストレスの関与が強く示唆された。また 10 月 12 日に腎臓 2 検体と鰓 3 検体、10 月 31 日に鰓 11 検体と腎臓 14 検体で菌分離され、うち 24 株は高病原性の A/G-C 型、残り 6 株は低病原性の A/A-C 型と判別された。2014 年のアユ大量へい死の際に検出されたタイプも A/G-C 型であり、今回の結果から 3 年間継続して同タイプが検出されたことになる。これまでの疫学調査から、鏡川での *F. psychrophilum* の周年定着を強く疑っており、この仮説を支持する結果が得られた。

6 月 2 日から 12 月 20 日まで 4 地点のうち、河川水 1 L あたり 10^6 オーダー以上のコピー数を示したのは 7 月 4 日の弘瀬と 10 月 31 日および 11 月 29 日の天神発電所前であった。前者の場合、*F. psychrophilum* は 22～27 $^{\circ}\text{C}$ の水温域では 2～7 日以内に死滅することから感染できない死菌も多く含まれていると思われた。一方、後者のコピー数は産卵期の感染拡大の影響によると考えられ、*F. psychrophilum* は水温 5 $^{\circ}\text{C}$ の条件下で 56 日間、水温 15 $^{\circ}\text{C}$ では 300 日間環境水中で生存できることから、天神発電所前で仔魚期や稚魚期の陸封アユに感染することは十分想定され、同アユが感染源となって翌年の遡上期に本菌を広域に拡散させる懸念が示唆された。よって、鏡ダム上流で継続しているアユの陸封化そのものが *F. psychrophilum* の定着を助長している可能性があるため、今後も調査を継続していく予定である。

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

本研究は、本症原因菌の河川における動態について長期間にわたり調査したことで、今後、本症に対する有効な対策を講じる上で有益な情報が多く得られている。

今年度の調査では、アユの大量斃死が認められる直前に大雨による重度の濁水が広範囲で発生したとあるが、大雨後の大量斃死は他の河川でも高頻度で認められる現象なのか？また、その後に本症の発症が頻発しているのか？について、今後情報収集を継続的に行うことが賢明であると思われる。さらに、濁度と暴露時間に依存してアユの血中コルチゾールが上昇することが確認されているとあるが、濁水に暴露されると保菌個体では本症発症に至る場合があると思われるが、本症が発生する為にはストレス要因に加えて、どこかで本症原因菌と接触する必要があると思われる。この点において鏡ダム上流でのアユの陸封化も一要因になり得ると考えられるが、今後は自然宿主の存在も視野に入れて継続的に本研究を進めることを期待したい。

4. 研究成果の公開実績・予定

高知県鏡川における鏡ダム上流本川のアユを対象にした *Flavobacterium psychrophilum* の継続的疫学調査 平成 29 年度日本水産学会春季大会