

高知県四万十川中・下流域における河川水中のアユ環境 DNA と  
フラボバクテリウム・サイクロフィラムの定量的検出に基づいたアユ細菌性  
冷水病の流行予測，ならびに産卵アユにおける本菌感染の実態把握

今城雅之<sup>1</sup>・佐野朝咲<sup>2</sup>・山下はづき<sup>3</sup>・加藤佑亮<sup>3</sup>・山本航大<sup>4</sup>・  
辻祐人<sup>5</sup>・大木正行<sup>6</sup>・堀岡喜久雄<sup>6</sup>

(<sup>1</sup>高知大学教育研究部自然科学系農学部部門・<sup>2</sup>高知大学農学部海洋生物生産学コース・<sup>3</sup>高知大学大学院総合人間自然科学  
研究科・<sup>4</sup>高知大学農林海洋科学部海洋資源学科海洋生物生産学コース・<sup>5</sup>四万十市役所・<sup>6</sup>四万十川中央漁業協同組合)

Prediction of Bacterial Cold-Water Disease Epidemics in Ayu within the Middle and Lower Reaches of the Shimanto River, Kochi  
Prefecture, Based on Quantitative Detection of Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) Environmental DNA and *Flavobacterium  
pshchrophilum* in the River Water, and Surveillance of the Infection in Spawning Ayu

Masayuki Imajoh<sup>1</sup>, Asaki Sano<sup>2</sup>, Hazuki Yamashita<sup>3</sup>, Yusuke Kato<sup>3</sup>, Kodai Yamamoto<sup>4</sup>,  
Yuto Tsuji<sup>5</sup>, Masayuki Ohgi<sup>6</sup> and Kikuo Horioka<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; <sup>2</sup> Aquaculture Course, Faculty of  
Agriculture, Kochi University; <sup>3</sup> Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University; <sup>4</sup> Aquaculture Course,  
Department of Marine Resource Science, Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University; <sup>5</sup> Shimanto City Office;  
<sup>6</sup> Shimantogawa Chuo Fisheries Cooperative Association.

**Abstract:** The Shimanto River, in western Kochi Prefecture on Shikoku Island in Japan, is the longest river in Shikoku, with a length of 196 km, and is known as Japan's last remaining limpid river. It was once famous for its abundance of ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) which is an important food staple in Japan. However, the catch has been low since the mid-1990s, because bacterial cold-water disease (BCWD), which is caused by *Flavobacterium psychrophilum*, has depressed the ayu population. In this study, we predicted the BCWD epidemics in ayu within the middle and lower reaches of the Shimanto River from April to December 2018. We also revealed the prevalence of the *F. pshchrophilum* infection in both mature ayu and post-spawning dead ayu on a spawning ground near the mouth of the river during the 2018 spawning season.

キーワード：四万十川，アユ，細菌性冷水病，フラボバクテリウム・サイクロフィラム，産卵場。

Keyword: Shimanto River, Ayu, Bacterial cold-water disease, *Flavobacterium pshchrophilum*, Spawning ground.

## はじめに

高知県西部に位置する四万十川は、幹川流路延長 196 km、流域面積 2,270 km<sup>2</sup> の四国最長の大河で、日本最後の清流として全国的な知名度を持ち、これまで 200 種類を超える全国トップレベルの魚種数が確認されている。その中で、アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) は重要な漁業対象魚種となる。農林水産省の内水面漁業生産統計調査によると、アユ漁獲量は 1980 年代初頭には 1,000 トン以上を記録し、全国有数の水準を誇ったものの、1990 年代以降著しく減少しており、長らくほぼ 2 桁で推移している状況にある。この低迷要因として、河川環境の変化、細菌性冷水病 (以下、冷水病) の発生と拡大、カワウ (*Phalacrocorax carbo*) による食害などが指摘されている (東, 2010)。冷水病は好気性グラム陰性長桿菌の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疾病で、全国各地の河川に生息するアユで発生が確認されていることから、全国的な蔓延が問題となっている (熊谷, 2016)。

四万十川において、冷水病の発生しやすい時期は、現地での感覚的な認識に基づいた経験則と水温の観点から高知県内の他河川よりも早い 5 月とされている。しかし、そもそもヒトのインフルエンザに代表されるように感染症の流行規模というのは、一般的にある集団の中から感染個体数を把握することで試算されるものであり、河川で生息するアユの場合、一定空間での生息尾数やその中での罹病魚数を正確に捉えることは不可能である。そのため、実際には冷水病流行の詳細はよく分かっておらず、対策を行うべき場所や時期を適切に判断できないため、各漁協がアユ資源を適正に管理・活用しているとは言えない状況にある。

近年、環境 DNA 分析と呼ばれる新たな資源量評価手法が注目され、土壌、海洋、河川などの環境試料中に含まれる生物から剥離した粘液や組織、排泄物由来の DNA を分析することで、遺伝子レベルから生物の生息状況が容易に推定可能となっている。中でもアユに関して、全国各河川で環境 DNA 分析が広く行われてきており、その豊富な実績からアユの生息分布の推定に高い信頼性を持つことが分かっている (高原ほか, 2016; 山中ほか, 2016; 乾ほか, 2017; 赤松ほか, 2017; Doi *et al.*, 2017; 内藤ほか, 2018; 河野ほか, 2018; 小出水と渡部, 2019)。また河川水からフラボバクテリウム・サイクロフィラムを検出・定量する手法もいくつか報告されている (永田と江口, 2007; Fujiwara-Nagata & Eguchi, 2009; Strepparava *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2018)。そこで、これら両手法を組み合わせることにより、これまで感覚的な認識に過ぎなかった現地でのアユ冷水病流行を客観的に評価するシステムを立ち上げ、2017 年から試行的にデータを収集している。そこで本報告では、2018 年に本システムで予測した四万十川中・下流域のアユ冷水病流行レベルと、そこで最大流行を記録した時期と場所のアユで明らかにしたフラボバクテリウム・サイクロフィラム感染実態について述べる。

## 材料と方法

## 採水作業

採水は 2018 年に各月一回の頻度で 4 月 23 日から開始し、5 月 31 日、6 月 20 日、7 月 18 日、8 月 14 日、9 月 19 日、10 月 23 日、11 月 19 日、12 月 14 日と計 9 回実施した。各地点の水温を YSI55 型 DO メーター (ワイエスアイ・ナノテック社製) で測定後、河川水 1 L をポリ瓶に入れて、氷を入れたクーラーボックスで保存した。採水時の様子を Fig. 1 に示した。

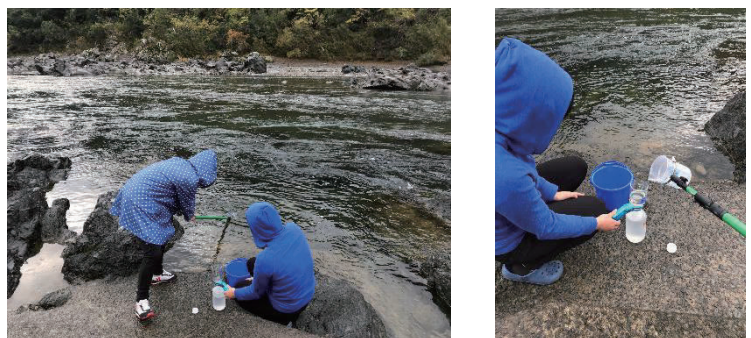


Fig. 1. 現地での採水作業の様子。

採水地点を Fig. 2 に示す。河口側から本川の赤鉄橋上流に St.1、佐田沈下橋直上流に St.2、勝間沈下橋直下流に St.3、口屋

内沈下橋下流にSt.4, 岩間大橋下流にSt.6, 津大橋下流にSt.7, 本川・広見川合流地点下流にSt.9, 長生沈下橋直下流にSt.10, 道の駅四万十とおわ前にSt.11, 第一三島沈下橋直下流にSt.12をそれぞれ設け, 支流の黒尊川にSt.5と目黒川小津賀沈下橋直下流にSt.8をそれぞれ設けた.

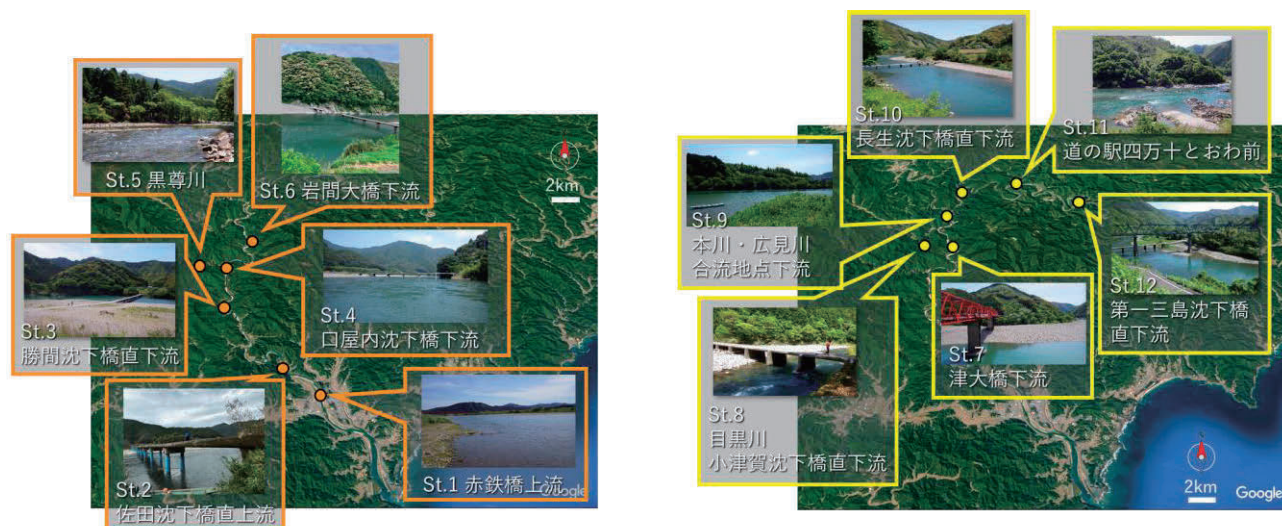


Fig. 2. 各採水地点の位置. 左が下流域, 右が中流域.

### 供試魚

アユ採捕はSt.1近くの小島で次の通り実施した. 健康親アユを投網で10月29日, 11月5日, 11月26日に採捕した (Fig. 3A). 死亡親アユを潜水で11月11日, 11月13日, 11月18日, 11月20日, 11月25日, 11月27日に採捕した (Fig. 3B). また, 潜水採捕を開始した日にHOBOウォーターテンプロ V2 (オンセット社製) におもりをつけて沈めて設置し (Fig. 3C), 11月11日17時から11月30日23時まで1時間毎の水温の連続測定を行った.

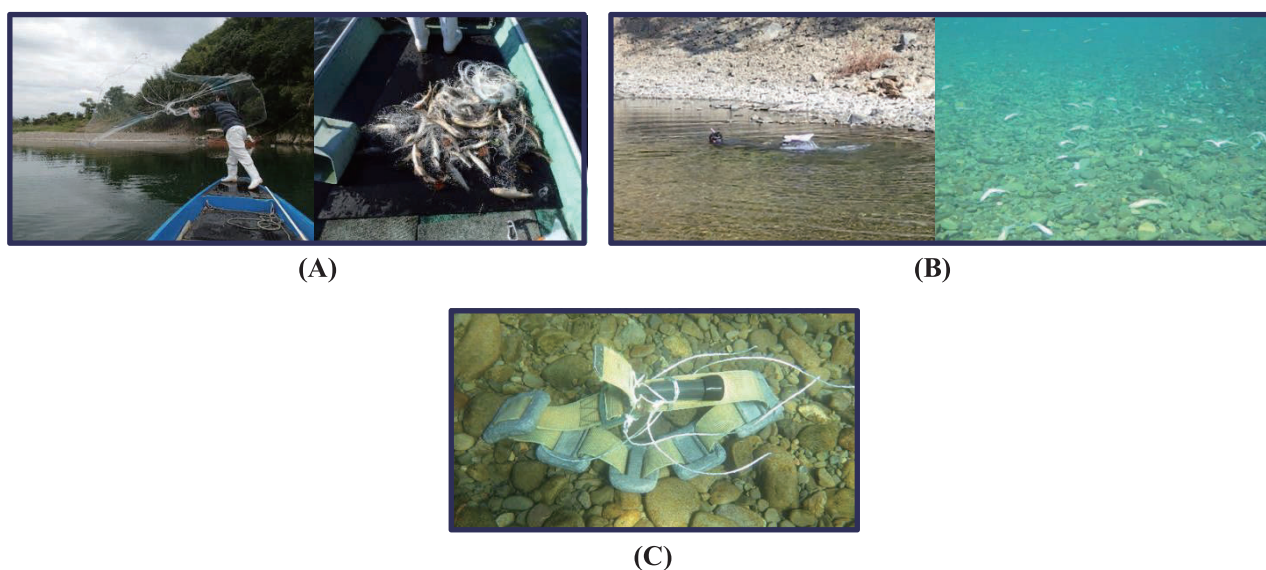


Fig. 3. 投網による健康親アユ採捕の様子 (A), 潜水による死亡親アユ採捕の様子 (B), および設置したロガーの様子 (C).



### 側線上方横列鱗数の計測

岐阜県河川環境研究所のマニュアル(岐阜県河川研究所, 2011)に従い, 採捕した死亡親アユ体表の右側面に白色水性絵の具を背鰭基部から腹部に向かって塗り, USBマイクロスコープで背鰭第1条基部から側線にかけての鱗数を計数した.

### DNA抽出

採水した河川水1 Lを孔径0.2  $\mu\text{m}$ のセルロース混合エステルメンブレンフィルター(アドバンティック社製)でろ過し, フィルター上の集積物からQIAamp DNA Miniキット(キアゲン社製)によりDNA抽出を行った.

採捕した健全・死亡親アユを解剖し, 鰓・体腎組織を摘出した. アユ疾病に関する防疫指針(農林水産省, 2011)に従い, 鰓組織からエラ洗浄濃縮液を作成した.  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $9,100 \times g$ , 15分間の遠心分離後, ペレットを溶解バッファー(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA-2Na, 1% SDS) 500  $\mu\text{L}$ に懸濁し, 同懸濁液にプロテイナーゼK溶液(20 mg/mL, タカラバイオ社製) 3  $\mu\text{L}$ を加え,  $55^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした. 体腎組織にはSTEバッファー300  $\mu\text{L}$ と同上プロテイナーゼK溶液3  $\mu\text{L}$ を加え,  $55^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした. 次に, 定法に従ってフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い, DNAペレットを適量, すなわち100-500  $\mu\text{L}$ 程度のTEバッファー(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)に懸濁した. 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)で測定し, 最終DNA濃度が100 ng/ $\mu\text{L}$ になるよう滅菌MQ水で希釈調整した.

### 菌分離と分離菌のDNA抽出

死亡親アユの鰓・体腎組織にディスポループを接触させ, 改変サイトファーガ寒天培地に画線した. 同培地は10 mLスケール組成でトリプトン(日本バクトン・ディッキンソン社製) 0.02 g, 酵母エキス(日本製薬社製) 0.005 g, 肉エキス(極東製薬工業社製) 0.002 g, 酢酸ナトリウム0.002 g, 塩化カルシウム0.002 g, 寒天0.15 gからなる. 画線後,  $18^{\circ}\text{C}$ で1週間培養し, 得られた黄褐色のコロニー1つを選び, 別の改変サイトファーガ液体培地20 mLで $18^{\circ}\text{C}$ , 1週間純培養した. 培養液6 mLから $20,400 \times g$ の1分間の遠心分離で菌体ペレットを得て, 上記の溶解バッファー300  $\mu\text{L}$ に懸濁後, プロテイナーゼK溶液3  $\mu\text{L}$ を加え,  $55^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした. その後, 上記と同様, フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行い, DNAペレットをTEバッファー100  $\mu\text{L}$ に懸濁した.

### on/offスイッチアッセイ

on/offスイッチアッセイはフラボバクテリウム・サイクロフィラムのジャイレースA (*gyrA*) 遺伝子領域の2箇所の一塩基多型を標的にしたFujiwara-Narata *et al.* (2012)の方法を改変して行った. 各プライマーの塩基配列は下記の通りで, フォワードプライマーとリバースプライマーから4通りの組み合わせでPCR反応を行った(3'末端にホスホロチエート結合を介した塩基を1つ導入, 以下の塩基配列の中で小文字で表す).

*gyrA*-125Gフォワードプライマー; 5'-TATCACCCACACGGAGAtG-3'

*gyrA*-125Aフォワードプライマー; 5'-TATCACCCACACGGAGAtA-3'

*gyrA*-202Cリバースプライマー; 5'-CTCCATCTACAGATCCAAaG-3'

*gyrA*-202Tリバースプライマー; 5'-CTCCATCTACA-GATCCAAaA-3'

PCR反応液は,  $5 \times$  PrimeSTARバッファー5  $\mu\text{L}$ , 各2.5 mM dNTPミクスチャー2  $\mu\text{L}$ , PrimeSTAR HS DNAポリメラーゼ0.25  $\mu\text{L}$ (タカラバイオ社製), 50  $\mu\text{M}$ 各プライマー溶液0.5  $\mu\text{L}$ , 分離菌由来DNA溶液1  $\mu\text{L}$ を含み, 滅菌水で全量25  $\mu\text{L}$ とした.



PCR反応はT100サーマルサイクラー（バイオラッド社製）で行い、95°Cで5分の初期熱変性後、98°Cで10秒の熱変性、61.5°Cで5秒のアニーリング、72°Cで30秒の伸長のサイクルを40回繰り返し、72°Cで5分間の追加伸長を行った。得られたPCR産物5 µLは3.0%アガロースゲルにロードし、100 vで約30分間電気泳動した。エチレンブロマイド溶液（0.625 mg/mL、アムレスコ社製）で10分の染色後、254 nm波長の紫外線照射下で増幅産物の有無を確認して、得られたバンドでのプライマーセットの組み合わせから、G-C型、G-T型、A-C型、A-T型のいずれかを判別した。

### Hinf I断片長解析

PCR増幅はロタマーゼ法（吉浦ら、2006）に従い、下記のプライマーセットを用いた。

fpPPIC1F; 5'-GTACCATGATACAGTCAGGTTTTTATACCA-3'

fpPPIC1R; 5'-GCGTTTTTAAATCCAACCTCTTGCTTCG-3'

PCR反応液は、10 × Ex Taq<sup>®</sup>バッファー5 µL、2.5 mM dNTPsミクスチャー4 µL、Ex Taq DNAポリメラーゼ0.25 µL（タカラバイオ社製）、50 µM各プライマー溶液0.2 µL、分離菌由来DNA溶液1 µLを含み、滅菌水で全量50 µLとした。PCR反応は上記同様の機器を用いて、95°Cで30秒の初期熱変性後、95°Cで15秒の熱変性、60°Cで30秒のアニーリング、72°Cで30秒の伸長のサイクルを35回繰り返し、72°Cで5分間の追加伸長を行った。得られたPCR増幅産物は制限酵素処理に供し、この反応組成は、PCR増幅産物5 µL、10×H buffer 1 µL、Hinf I 0.2 µL（10 U/µL、タカラバイオ社製）を含み、滅菌水で全量10 µLとした。37°Cで3時間の消化産物10 µLを3%アガロースゲルにロードして、電気泳動後、制限酵素断片長からA型（63 bp、129 bp、154 bpからなる3断片長）とB型（154 bpと192 bpからなる2断片長）を判別した。

### リアルタイムPCR法

フラボバクテリウム・サイクロフィラムの検出は、ロタマーゼ遺伝子群の1つであるpeptidyl-prolyl cis-trans isomerase C（PPIC）遺伝子とβ<sup>+</sup> DNA-dependent RNA polymerase（*rpoC*）遺伝子、アユの検出は、ミトコンドリアDNAのcytochrome b（*cyt b*）遺伝子をそれぞれ標的とした。PPIC遺伝子について今城ら（2017）、*rpoC*遺伝子についてStrepparava *et al.*（2014）、*cyt b*遺伝子についてYamanaka & Minamoto（2016）のプライマーとプローブセットを用いて、下記の通りであった。

PPIC遺伝子フォワードプライマー; 5'-CCTTCGATGTAGTTTCTGTGC-3'

PPIC遺伝子リバースプライマー; 5'-TTCTAATTCACGAGATTCGTCTG-3'

PPIC遺伝子プローブ; 5'-FAM-AACCTACAGATGCGGAACCTAATCGCC-BHQ1-3'

*rpoC*遺伝子フォワードプライマー; 5'-GAAGATGGAGAAGGTAATTTAGTTGATATT-3'

*rpoC*遺伝子リバースプライマー; 5'-CAAATAACATATCCTTTTTCTACAACCTGA-3'

*rpoC*遺伝子プローブ; 5'-FAM-AAACGGGTATTCTTCTTGTCTACA-MGB-3'

*cyt b*遺伝子フォワードプライマー; 5'-CCTAGTCTCCCTGGCTTATTCTCT-3'

*cyt b*遺伝子リバースプライマー; 5'-GTAGAATGGCGTAGGCGAAAA-3'

*cyt b*遺伝子プローブ; 5'-FAM-ACTTCACGGCAGCCAACCCCC-TAMRA-3'

PPIC遺伝子の増幅反応は、Prime Time Gene Expressionマスターミックス（インテグレートDNAテクノロジーズ社製）、*rpoC*遺伝子と*cyt b*遺伝子は、TaqMan Fast Advancedマスターミックス（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）をそれぞれ用いた。前者の反応液は、Prime Time Gene Expressionマスターミックス5 µL、10 µM各プライマー溶液0.3 µL、5 µM

プローブ溶液0.4  $\mu\text{L}$ , 鰓・体腎組織試料由来DNA溶液0.5  $\mu\text{L}$ , 滅菌水3.5  $\mu\text{L}$ からなる全量10  $\mu\text{L}$ , 後者は, TaqMan Fast Advancedマスターミックス10  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{M}$ 各プライマー溶液0.6  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{M}$ プローブ溶液0.8  $\mu\text{L}$ , 環境水試料由来DNA溶液1  $\mu\text{L}$ , 滅菌水7  $\mu\text{L}$ からなる全量20  $\mu\text{L}$ とした. 1サンプルにつき3本立てで行い, PCR反応はStepOne PlusリアルタイムPCRシステム(ライフテクノロジーズ社製)を用いて, 反応条件は両マニュアルに従い, 熱変性とアニール・伸長のサイクルを40回繰り返した. 解析はStepOne Software v2.3(ライフテクノロジーズ社製)で行い, 得られたCt値から各遺伝子のコピー数を以下の検量線で算出した.

上記3つのプライマーセットで得たPCR増幅産物をTAクローニングに用いた. *PPIC*遺伝子をTarget Cloneキット(東洋紡ライフサイエンス社製)でpTA2ベクター, *cyt b*遺伝子をDynaExpress TA PCRクローニングキット(バイオダイナミクス研究所社製)でpTAC-2ベクター, *rpoC*遺伝子をTA-Enhancer クローニングキット(ニッポンジーン社製)でPANTベクターにそれぞれクローニングした. 同プラスミドをECOSコンピテント*E.coli* JM109株(ニッポンジーン社製)に形質転換した. 得られたコロニーを釣菌してアンピシリン混合(終濃度50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )ブレインハートインヒュージョン液体培地20 mL(ディフコ社製)に入れ, 37°Cで一晩培養後, QIAGEN Plasmid Maxiキット(キアゲン社製)を用いて組み換えプラスミドを抽出・精製した. 得られたプラスミド溶液のDNA純度と収量をQ5000微量紫外可視分光光度計で測定して, アボガドロ定数からプラスミドコピー数を算出し, 調整したものをコントロールプラスミド原液とした. PCR反応は上記同様の機器と条件で行い, 鋳型として10倍階段希釈したコントロールプラスミドDNA溶液を用いて検量線を作成した.

## 結果と考察

四万十川中・下流域各12地点の水温, アユ*cyt b*遺伝子, フラボバクテリウム・サイクロフィラム(以下, 菌) *rpoC*遺伝子の推移をFig. 4に示した. これまで, アユ環境DNAの検出範囲は採水地点から上流400~800 mとの報告はあるものの(赤松ほか, 2017), 河川環境によって大きく変わることは容易に想像され, かつ本研究で得られたアユ*cyt b*遺伝子量からそのままアユの生息尾数を推定することは難しい. その一方で, 河川水の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と想定され, 菌*rpoC*遺伝子はシングルコピー遺伝子のため, 同遺伝子量をそのまま推定菌数に換算できる(Streparava *et al.*, 2014). 尚, 6月20日は大雨による重度の濁水の影響から適切な結果が得られていないと判断した.

河川水1 Lあたりのアユ*cyt b*遺伝子をみると, 調査開始の4月23日は全12地点で7.E+03~1.E+05 copiesで検出され, その中で最上位置のSt.12が最高値を示し, 中流域まで遡上した稚アユの状況を反映したものと考えられた. その後, 同遺伝子はSt.7, St.9, St.10, St.11, St.12の本川5地点とSt.5, St.8の支流2地点で緩やかに増加し, 7月18日または8月14日のいずれかでピークに達した. その一方で, その間にSt.1, St.2, St.3, St.4, St.6の本川5地点では大きな変動量が示されず, アユはかなりいるがサイズが小さいとSt.4での聞き取り情報から推測して, 生息尾数よりも成長不良による差が生じていたのかもしれない.

上記期間中, 河川水1 Lあたりの菌*rpoC*遺伝子は4月23日に6地点で5.E+02~6.E+03 copies, 5月31日に7地点で6.E+02~7.E+03 copiesで検出され, 支流のSt.5で目立った高値が示された. 一方, 6月20日~9月19日を見ると, まず, 6月20日にSt.5で7.E+02 copies(ただし濁水の影響で適切かは不明), 次に, 7月18日にSt.5で6.E+02 copiesとSt.11で5.E+02 copiesと検出地点数が大幅に減少し, その後, 8月14日に7地点で4.E+02~2.E+03 copies, 9月19日に9地点で5.E+02~2.E+03 copiesと検出地点数は再び多くなったものの, 増加傾向になかった. これらの推移から, 河川水の菌量の増減は少なくともアユの生物量に依存しないことが分かり, 水温の影響を強く受けると示唆された. この根拠として, 培養条件下のフラボバクテリウム・サイクロフィラムの増殖速度は22~23°Cでは温度が高いほど遅くなり, 24~26°Cでは増殖せずに菌数は減少し, 27°Cでは3日間, 28°Cでは1日間で死滅するとの報告から(農林水産省, 2008), 7月18日は24°C以上, 8月14日に25.7°C以上, 9月19日に20.1°C以上と感染アユでの増殖が高水温で抑制されていたと考えられる. また別の報告から, 本菌は環境

水等の飢餓条件では増殖することができず、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とされ（Sugahara *et al.*, 2010），高水温時には排菌された菌は数日で死菌になることも考慮される。

9月19日のアユ*cyt b*遺伝子はSt.12で大幅に減少しており、産卵のための流下期への移行によると思われる。9月19日と10月23日にSt.9で2.E+05 copies，10月23日には加えてSt.7でも2.E+05 copiesとそれぞれ目立った高値となり，両地点は本川と支流の合流付近であるため，一時的に流下親アユの集積した様子が伺われた。また，10月23日以降になると，遡上期や定着期にはなかったアユ*cyt b*遺伝子と菌*rpoC*遺伝子との増減推移が概ね一致するようになり，この傾向に転じた要因として，次の2つが挙げられる。1つ目は水温で，9月19日の20.1~24.0°Cから10月23日の16.1~18.9°Cとフラボバクテリウム・サイクロフィラムの至適増殖温度にまで低下した水温環境にあったこと，2つ目は親アユの非特異免疫能で，アユは性成熟に伴ってフラボバクテリウム・サイクロフィラムに対する体腎白血球の貪食活性と血清殺菌活性が低下するとされている（Minami *et al.*, 2018）。そのため，流下期になると，遡上期や定着期と違って親アユからの排菌量が多くなるのは必然であり，河川水の菌量も当初は水温のみが，次第に水温を含めたアユ生物量へと依存が大きく変化するものと示唆された。

四万十川におけるアユ主要産卵場は河口から9.6~13 km区間であり，河口側より小畠，大墜，大浦，入田と呼ばれる場所がある（岡田と松岡，2017）。本研究で設けたSt.1は小畠に位置し，11月19日にアユ*cyt b*遺伝子と菌*rpoC*遺伝子は3.E+06 copiesと3.E+05 copiesとともに年間の最高値となり，次の12月14日も2.E+06 copiesと1.E+05 copiesと高値が続いた。これは，四万十川が誇る産卵親アユの多さと，それらの保菌状態が反映されたものと考えれば当然の結果である。また，この時期特有の死亡親アユの大量出現も大きく影響したと仮定され，感染アユからの排菌量は死亡前よりも死亡後の方が多いとされること（大原ほか，2010）からも強く支持される。この点についてさらに詳細に検討したことを以下に述べた。

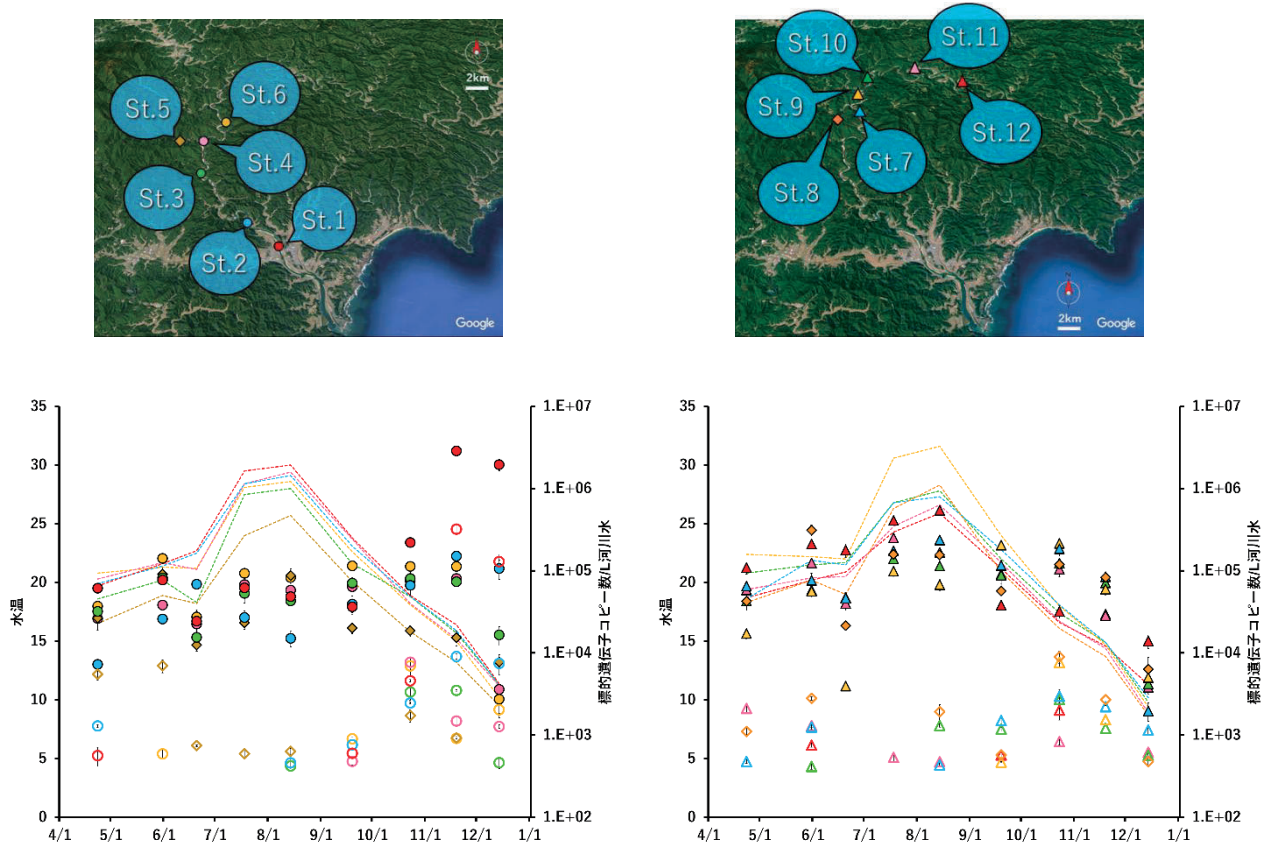


Fig. 4. 各採水地点に対応したシンボルの表示（上）と各地点でのリアルタイムPCRによるアユ*cyt b*遺伝子（塗りつぶしシンボル）と菌*rpoC*遺伝子（白抜きシンボル）の推移（下）。破線は水温を表す。



小島で採捕した健常親アユと死亡親アユの尾数、全長、魚体重、また死亡親アユについて側線上方横列鱗数16枚以下の放流アユと判別された尾数をTable 1に示した。尚、死亡親アユの採捕は11月6日に開始したが、まだ産卵が本格的に始まっておらず、採捕することができなかった。採捕した死亡親アユのほとんどは天然由来と判別され、四万十川特有のアユ資源の多さを示した結果となった。

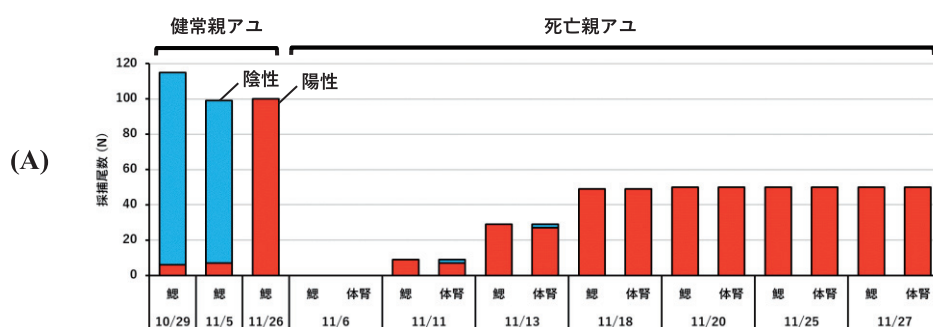
健常親アユの鰓と死亡親アユの鰓・体腎におけるフラボバクテリウム・サイクロフィラム (以下、菌) 陽性検

体数とフラボバクテリウム・サイクロフィラム (以下、菌) *PPIC*遺伝子量をFig. 5AとFig. 5B、小島の水温推移をFig. 5Cに示した。健常親アユの鰓での菌陽性検体数は10月29日で6/115検体 (5.2%)、11月5日で7/99検体 (7.1%)、11月26日で100/100検体 (100%) となり、産卵期後半に位置付けられる11月下旬に急上昇した。さらに、それらでの100 ng総DNAあたりの菌*PPIC*遺伝子は、10月29日に $2.E+01 \sim 6.E+02$  copies、11月5日に $3.E+01 \sim 4.E+03$  copies、11月26日に $6.E+01 \sim 4.E+05$  copiesとなり、陽性率だけでなく菌数も伴って増加していたことが分かり、約一か月の間に小島まで流下した親アユ間で顕著な感染拡大が起きていたことが明らかになった。

潜水調査時の観察から、11月11日～27日まで日を追うごとに死亡親アユを多く見かけるようになり (data not shown)、期間中に6回回収した。死亡親アユの鰓・体腎における菌陽性検体数と菌*PPIC*遺伝子量は、11月11日の鰓で9/9検体 (100%) と $3.E+03 \sim 3.E+04$  copies、体腎で7/9検体 (77.8%) と $1.E+02 \sim 5.E+03$  copies、11月13日の鰓で29/29検体 (100%) と $4.E+02 \sim 6.E+04$  copies、体腎で27/29検体 (93.1%) と $1.E+02 \sim 2.E+04$  copies、11月18日の鰓で49/49検体 (100%) と $8.E+01 \sim 1.E+05$  copies、体腎で49/49検体 (100%) と $4.E+01 \sim 9.E+03$  copies、11月20日の鰓で50/50検体 (100%) と $1.E+02 \sim 6.E+04$  copies、体腎で50/50検体 (100%) と $5.E+01 \sim 5.E+04$  copies、11月25日の鰓で50/50検体 (100%) と $4.E+02 \sim 3.E+05$  copies、体腎で50/50検体 (100%) と $3.E+02 \sim 2.E+04$  copies、11月27日の鰓で50/50検体 (100%) と $2.E+03 \sim 4.E+05$  copies、体腎で50/50検体 (100%) と $2.E+02 \sim 1.E+05$  copiesであった。よって、総じて鰓では主に $10^3 \sim 10^5$ オーダーで検出されたのに対して、体腎では主に $10^2 \sim 10^4$ オーダーと鰓の方が高量となり、好氣的環境を必要とするフラボバクテリウム・サイクロフィラムに特徴的な性質が同遺伝子量と相関した。また死亡親アユの本菌への高率・高量での感染状態を確認でき、それらから大量排菌された状況は容易に推測できる。また、上記で述べた親アユでの感染拡大もあわせて考えると、河川水を用いて遺伝子レベルからアユ冷水病流行レベルを把握する我々のシステムはそうした状況を的確に捉えたものであったと言える、改めてその有用性を示すことができた。

Table 1. 採捕親アユの詳細.

日時	採捕尾数 (放流由来)	平均全長 $\pm$ S.D. (cm)	平均体重 $\pm$ S.D. (g)
<b>健常親アユ</b>			
10/29	115	19.2 $\pm$ 3.1	56.7 $\pm$ 29.6
11/5	99	21.3 $\pm$ 2.6	77.1 $\pm$ 27.2
11/26	100	19.6 $\pm$ 2.5	52.6 $\pm$ 16.9
<b>死亡親アユ</b>			
11/6	—	—	—
11/11	9 (3)	19.5 $\pm$ 4.4	55.6 $\pm$ 35.5
11/13	29 (2)	22.5 $\pm$ 3.0	75.5 $\pm$ 30.2
11/18	49 (1)	21.4 $\pm$ 3.1	66.6 $\pm$ 29.7
11/20	50 (2)	19.6 $\pm$ 3.2	51.1 $\pm$ 23.0
11/25	50 (2)	21.7 $\pm$ 3.0	66.2 $\pm$ 25.3
11/27	50 (2)	21.7 $\pm$ 2.3	61.9 $\pm$ 19.4



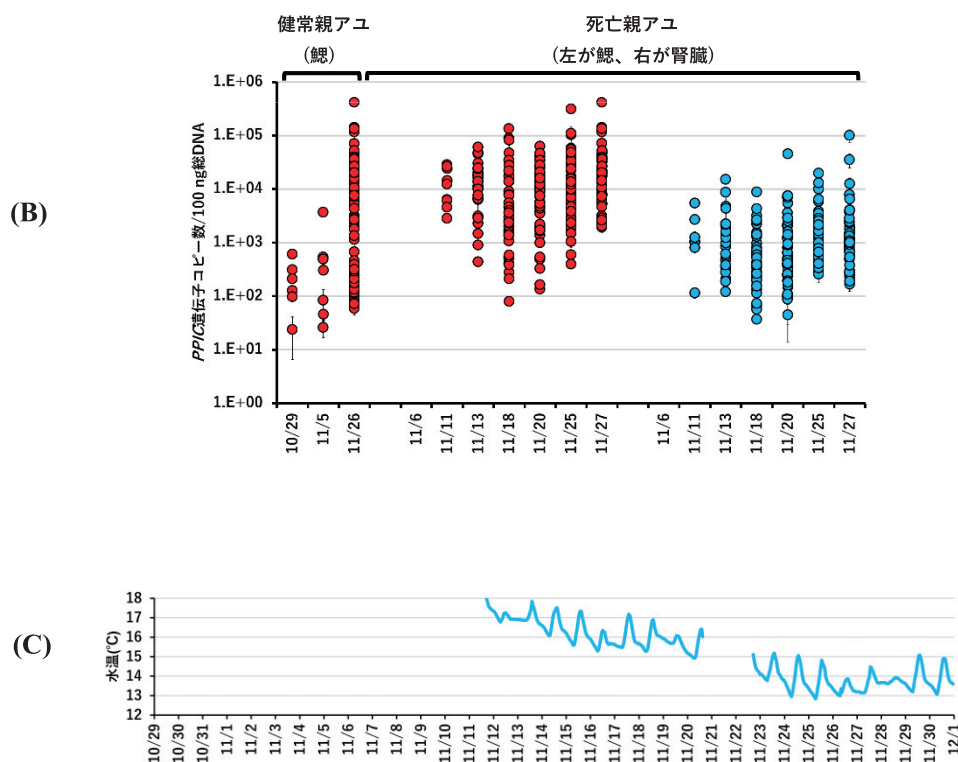


Fig. 5. リアルタイム PCR による健常親アユの鰓と死亡親アユの鰓・体腎におけるフラボバクテリウム・サイクロフィラム陽性検体数 (A), 陽性検体における菌 *PPIC* 遺伝子量 (B), 小島での 1 h 毎の水温推移 (C).

死亡親アユの菌分離率をFig. 6Aに示す. 11月11日の9検体から鰓で44.4%と体腎で55.6%, 11月13日の29検体から鰓で72.4%と体腎で82.8%, 11月18日の49検体から鰓で51%と体腎で59.2%, 11月20日の50検体から鰓で72%と体腎で86%, 11月25日の50検体から鰓で48%と体腎で70%, 11月27日の50検体から鰓で20%と体腎で36%となった. これはリアルタイムPCRで得られた菌陽性率よりも明らかに低く, 腐敗の進行具合が個体間で大きくばらつき, 菌分離できなかった検体のほとんどは腐敗が過度に進行したものであったことが理由に挙げられた.

フラボバクテリウム・サイクロフィラムの遺伝子型について, 宿主に対する感受性の違いから, アユやオイカワで見られるA型と, ニジマスやギンザケ, アユ, その他魚種で見られるB型 (Izumi *et al.*, 2003), アユに対する病原性の違いから, 高病原性のG-C型, 低病原性もしくは非病原性のA-C型, 非病原性のA-TとG-T型 (Fujiwara-Nagata *et al.*, 2012) が知られている. 本研究ではこれらの遺伝子型を組み合わせ, 死亡親アユから分離できた菌株を4タイプ, すなわち, A/G-C型, A/A-C型, A/A-T型, B/A-C型のいずれかに分類することができた (Fig. 6B). つまり, 11月11日の鰓・体腎分離株はA/GC型のみ, 11月13日の鰓分離株はA/GC型 (95.2%) とA/AC型 (4.8%), 体腎分離株はA/GC型 (75%), A/AC型 (20.8%), A/AT型 (4.2%), 11月18日の鰓分離株はA/GC型 (68%), A/AC型 (24%), B/AC型 (8%), 体腎分離株はA/GC型 (79.3%), A/AC型 (13.8%), A/AT型 (6.9%), 11月20日の鰓分離株はA/GC型 (77.8%), A/AC型 (19.4%), B/AC型 (2.8%), 体腎分離株はA/GC型 (86%), A/AC型 (11.6%), A/AT型 (2.3%), 11月25日の鰓分離株はA/GC型 (58.3%), A/AC型 (33.3%), B/AC型 (8.3%), 体腎分離株はA/GC型 (74.3%), A/AC型 (8.6%), A/AT型 (2.9%), B/AC型 (14.3%), 11月27日の鰓分離株はA/GC型 (40%), A/AC型 (50%), B/AC型 (10%), 体腎分離株はA/GC型 (55.6%), A/AC型 (16.7%), A/AT型 (5.6%), B/AC型 (22.2%) であった. よって, 死亡親アユからはアユに感染しかつ高病原性タイプとされるA/G-C型が優占的に検出された一方, 他タイプの感染も見られたことで, もしかすると, 遡上期から流下期まで違った時期や場

所で感染を繰り返し経験して色々なタイプを保菌するのかもしれない。

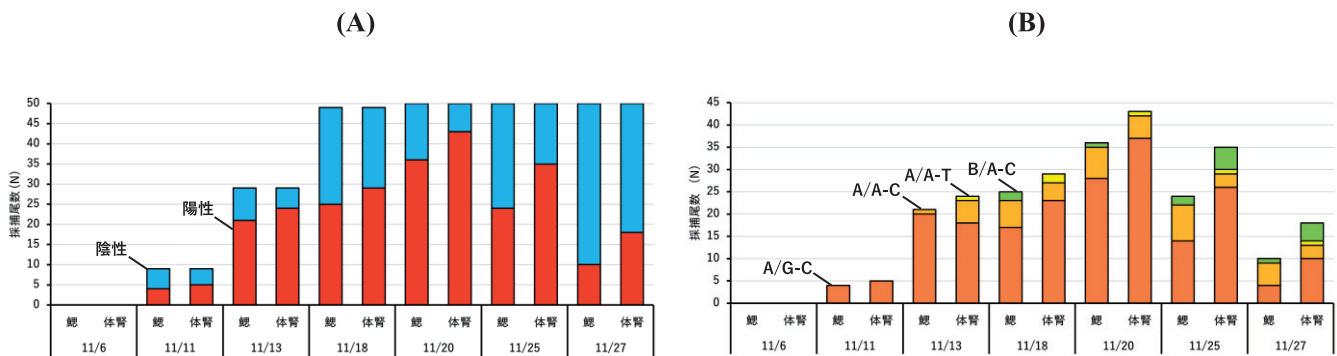


Fig. 6. 死亡親アユの鰓・体腎における菌分離検体数 (A) と同分離菌の遺伝子型 (B) .

以上をまとめると、四万十川中・下流域において、アユとフラボバクテリウム・サイクロフィラムの遺伝子レベルから把握した最大の冷水病流行は本来の発生盛期とされる5月ではなく、11月と12月の河口付近の産卵場で引き起こされ、保菌した産卵親アユの存在が大規模な感染拡大の原動力になっていると考えられる。産卵親アユに冷水病が蔓延している状況は、本来の産卵活動の低下リスクを招いている可能性が高く、翌年の資源量に悪影響を及ぼすことを指摘するものもある。特に懸念されることは未産卵の雌アユの冷水病による死亡である。一般的に冷水病の死因は患部からの出血による貧血死とされるが(農林水産省, 2008), 産卵場の河川水中には大量の菌が存在していることと、産卵親アユは多傷と免疫低下から菌の侵入・増殖を許しやすい状態にあることから、大量の菌が血液を介して一気に全身に回って臓器障害に陥る、いわゆる敗血症を起こすリスクがある。今後、産卵親アユがどの程度の冷水病リスクを持ち、産卵効率の低下に繋がるのかを明らかにする必要があり、中でも興味深いのは雌アユの保菌率の推移で、アユの産卵数は魚体重1gにつき約800粒の卵を持つとされる試算から、産卵数の損失をある程度算出できると考える。

#### 参考文献

- 東健作 (2010) 四万十川におけるアユの長期的な漁獲変動と近年の特徴. 水産増殖, 58, 401–410.
- 熊谷明 (2016) 細菌性冷水病. 魚病研究, 51, 153–157.
- 高原輝彦・山中裕樹・源利文・土居秀幸・内井喜美子 (2016) 環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～. 日本生態学会誌, 66, 583–599.
- 山中裕樹・源利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸 (2016) 環境DNAの野外調査への展開. 日本生態学会誌, 66, 601–611.
- 乾隆帝・後藤益滋・河野誉仁・赤松良久・掛波優作・一松晃弘 (2017) 江の川における環境DNA分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討. 水工学論文集B1, 73, I\_1105–I\_1110.
- 赤松良久・乾隆帝・一松晃弘・河野誉仁・土居秀幸 (2017) 環境DNAを用いた河川内の魚類現存量推定に関する基礎的検討. 水工学論文集B1, 73, I\_1111–I\_1116.
- Doi, H., R. Inui, Y. Akamatsu, K. Kanno, H. Yamanaka, T. Takahara and T. Minamoto (2017) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. Freshw. Biol., 62, 30–39.
- 内藤太輔・赤松良久・乾隆帝・後藤益滋・小室隆・今村史子 (2018) 環境DNAによる多摩川流域におけるアユの生息状



- 況の把握. 水工学論文集B1, 74, I\_517-I\_522.
- 河野誉仁・赤松良久・乾隆帝・後藤益滋・山口皓平（2018）環境DNA分析により得られた夏季のアユの生息状況と河川水温の関係性の検討. 土木学会論文集GI, 74, II\_457-III\_462.
- 小出水規行・渡部恵司（2019）環境DNAを利用したアユ稚魚の遡上モニタリング. 第68回農業農村工学会大会講演会講演要旨集, 778-779.
- 永田恵里奈・江口充（2007）環境水におけるアユ冷水病菌 *Flavobacterium psychrophilum* の定量的モニタリング. 日本水産学会誌, 73, 306-309.
- Fujiwara-Nagata E and M. Eguchi (2009) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Flavobacterium psychrophilum*. J. Fish Dis., 32, 873-881.
- Strepparava, N., T. Wahli, H. Segner and O. Petrini (2014) Detection and quantification of *Flavobacterium psychrophilum* in water and fish tissue samples by quantitative real time PCR. BMC Microbiol., 14:105.
- Nguyen, P.L., P.S. Sudheesh, A.C. Thomas, M. Sinnesael, K. Haman and K.D. Cain (2018) Rapid detection and monitoring of *Flavobacterium psychrophilum* in water by using a handheld, field-portable quantitative PCR system. J. Aquat. Anim. Health., 30, 302-311.
- 岐阜県河川環境研究所（2011）アユの側線上方横列鱗数の計数マニュアル Ver. 1. 岐阜県河川環境研究所, 各務原, pp.1-11.
- 農林水産省（2011）アユ疾病に関する防疫指針. アユ疾病対策協議会, pp.1-35.
- Fujiwara-Nagata, E., J. Ikeda, K. Sugahara and M. Eguchi (2012) A novel genotyping technique for distinguishing between *Flavobacterium psychrophilum* isolates virulent and avirulent to ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis* (Temminck & Schlegel) . J. Fish Dis., 35, 471-480.
- 吉浦康寿・釜石隆・中易千早・乙竹充（2006）Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C 遺伝子を標的とした PCR による *Flavobacterium psychrophilum* の判別と遺伝子型. 魚病研究, 41, 67-71.
- 今城雅之・山崎憲一・山下はづき・門野真弥・片岡榮彦・大崎靖夫・高橋徹（2017）高知県鏡川におけるアユ細菌性冷水病の疫学調査. 魚病研究, 52, 141-151.
- Yamanaka, H. and T. Minamoto (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. Ecol. Indic., 62, 147-153.
- 農林水産省（2008）アユ冷水病対策協議会取りまとめ. アユ疾病対策協議会, pp.1-23.
- Sugahara, K., E. Fujiwara-Nagata and M. Eguchi (2010) Dynamics of the bacterial cold-water disease pathogen, *Flavobacterium psychrophilum*, in infected fish organs and rearing water after warmed water treatment. Fish Pathol., 45, 58-65.
- Minami, S., K. Suzuki, S. Watanabe, M. Sano and G. Kato (2018) Maturation-associated changes in the non-specific immune response against *Flavobacterium psychrophilum* in Ayu *Plecoglossus altivelis*. Fish Shellfish Immunol., 76, 167-173.
- 岡田将治・松岡直明（2017）四万十川におけるアユの産卵に適した新たな環境場の創出に向けた取り組み. 流域圏学会誌, 11-17.
- 大原健一・景山哲史・桑田知宣・海野徹也・古澤修一・吉浦康寿（2010）リアルタイムPCRを用いたアユ冷水病魚における *Flavobacterium psychrophilum* の定量性の検討. 日本水産学会誌, 75, 258-260.
- Izumi, S., F. Aranishi and H. Wakabayashi (2003) Genotyping of *Flavobacterium psychrophilum* using PCR-RFLP analysis. Dis. Aquat. Organ., 56, 207-214.