

高知県物部川下流域のアユ産卵期における  
フラボバクテリウム・サイクロフィラムの疫学調査

今城雅之<sup>1</sup>・大竹夢<sup>2</sup>・加藤佑亮<sup>3</sup>・山本航大<sup>2</sup>・福西晃育<sup>3</sup>・松浦秀俊<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>高知大学教育研究部自然科学系農学部門・<sup>2</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>3</sup>高知大学大学院総合人間自然科学研究科・<sup>4</sup>物部漁業協同組合)

An Epidemiological Survey of *Flavobacterium psychrophilum* during the Spawning Season of Ayu  
in the Lower Reaches of the Monobe River, Kochi Prefecture

Masayuki Imajoh<sup>1</sup>, Kanae Otake<sup>2</sup>, Yusuke Kato<sup>3</sup>, Kodai Yamamoto<sup>2</sup>, Kosuke Fukunishi<sup>3</sup> and Hidetoshi Matsuura<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; <sup>2</sup> Aquaculture Course, Department of Marine Resource Science, Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University; <sup>3</sup> Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University; <sup>4</sup> Monobegawa Fisheries Cooperative Associations

**Abstract:** The Monobe River, which is a first-class river in Kochi Prefecture, is 71 km long, with a watershed covering 508 km<sup>2</sup>. Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) is a popular angling fish in Japan. The ayu population in the Monobe River has been negatively affected by *Flavobacterium psychrophilum* since the mid-1990s. In this study, we carried out an epidemiological survey of *F. psychrophilum* during the spawning season of ayu in the lower reaches of the Monobe River.

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

Keywords: Monobe River, Ayu, Artificial spawning ground, *Flavobacterium psychrophilum*, Bacterial cold disease.

## はじめに

高知県物部川は、香美市の標高 1,770 m の白髪山に発し、本県において四万十川、仁淀川に次ぐ流路延長 71 km、流域面積 508 km<sup>2</sup> の第 3 の河川である (国土交通省<sup>1)</sup>。本河川の大きな特徴は河床勾配にあり、永瀬ダムより上流域で約 1/40、合同堰から永瀬ダム間の中流域で約 1/145、合同堰から下流域で約 1/280 の急流のため、洪水の流出が早く、短期で流出量が急増する傾向にある (門田ほか<sup>2)</sup>。

物部川は、かつて高知県下でアユ漁獲量の多い河川であり、1980 年代前半には 70 トン超に上った。しかし、1993 年を境に 20 トンにまで落ち込み、さらには、2006 年に 1 トン未満の非常事態を経験するなど、長期的な低迷が今なお続いている (物部川漁協協同組合<sup>3)</sup>。そうした状況を打開すべく、物部川漁業協同組合が中心となり、流域や行政も取り込んだ「物部川方式」と呼ばれる様々な環境保全活動を通じ、流域環境問題の共通認識と解決に向けた連携が図られている (小畑と渡邊<sup>4)</sup>。そのひとつが、天然アユ資源の増大を目指した人工産卵場の造成である。しかしながら、産卵親アユに対し、*Flavobacterium psychrophilum* を原因とする細菌性冷水病 (以下、冷水病) について、これまでに疫学調査が行われたことはない。

そこで、本研究では、産卵期を主とした時期に、下流域の河川水から遺伝子レベルで冷水病の流行を推定するとともに、人工産卵場の産卵親アユにおける *F. psychrophilum* 感染実態を把握することを目的とした。

## 材料と方法

### 採水地点と供試水

採水地点として下流域に 4 地点、すなわち、町田堰直下流に St.1、戸板島橋直下流に St.2、物部川橋直下流に St.3、ヨコゼに St.4 を設けた (Fig. 1)。採水作業は、2019 年 9 月から 12 月まで週 5 回で実施し、現地にて河川水 1 L をポリ瓶に採水して、直ちに研究室に持ち帰った。尚、St.3 は 11 月 6 日以降、川の形と水の流れが変わり、採水可能な範囲が極端に狭まったため、視界内での若干の場所の変更を余儀なくされた。

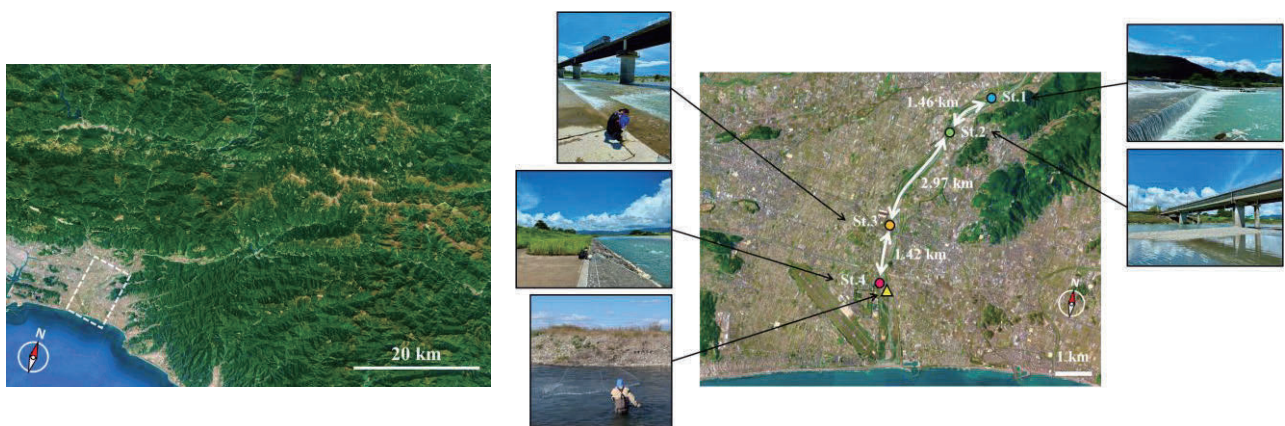


Fig. 1. 破線内が今回調査した物部川下流域エリア(左)と、St.1からSt.4の採水地点とSt.4下のアユ採捕地点(右)。

### 供試水からのDNA抽出

採水した河川水 1 L を、孔径 0.2 μm 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 抽出した。

### 供試アユ

アユ採捕は、高知県特別採捕許可（内特997号）を得た上、St.4下で実施した。採捕期間は、2019年11月14日から12月3日までとした。死亡親アユの回収は、2019年11月14日から12月18日までとし、以降、良い状態の個体が回収できなくなったため、継続困難と判断した。親アユは投網で5回採捕し、平均全長 $20.6 \pm 2.0$  cm、平均体重 $60.0 \pm 19.8$  gの148尾であった。死亡親アユはたも網と潜水で16回採捕し、平均全長 $20.6 \pm 2.5$  cm、平均体重 $55.8 \pm 25.2$  gの132尾であった。各アユの生殖腺熟度指数（GSI）は、生殖腺重量  $\times$  100/体重（g）より求めた。また、由来判別の基準アユとして、鏡川漁業協同組合より、平均全長 $11.0 \pm 1.3$  cm、平均体重 $10.0 \pm 4.1$  gの放流アユ100尾を入手した。

### 側線上方横列鱗数の計数

既報（今城ほか<sup>5)</sup>）に従い、USBマイクロスコープを用いて、各アユの背鰭第1条基部から側線までの鱗数を計数した。

### 鰓組織からのDNA抽出

各アユから鰓組織を摘出して、農林水産省<sup>6)</sup>のアユ疾病に関する防疫指針に従い、エラ洗浄濃縮液を作成した。4°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  $\mu$ 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  $\mu$ Lを加え、55°Cで一晩インキュベートした。次に、定法のフェノール・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  $\mu$ 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/ $\mu$ Lになるよう、滅菌MQ水で希釈調整した。

### qPCR法

*F. psychrophilum*の検出は、 $\beta'$  DNA-dependent RNA polymerase (*rpoC*) 遺伝子、アユは、ミトコンドリアDNAのcytochrome b (*cyt b*) 遺伝子を標的とし、前者は、Streparava *et al.*<sup>7)</sup>、後者は、Yamanaka & Minamoto<sup>8)</sup>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。

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

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

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

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

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

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

環境水試料由来DNA溶液を用いた菌*rpoC*遺伝子とアユ*cyt b*遺伝子の増幅反応は、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）、鰓組織試料由来DNA溶液を用いた菌*rpoC*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）で行った。前者の反応液は、TaqMan Fast Advancedマスターミックス10  $\mu$ L、10  $\mu$ M各プライマー溶液0.6  $\mu$ L、5  $\mu$ Mプローブ溶液0.8  $\mu$ L、環境水試料由来DNA溶液1  $\mu$ L、滅菌水7  $\mu$ Lからなる全量20  $\mu$ L、後者は、Prime Time Gene Expressionマスターミックス5  $\mu$ L、10  $\mu$ M各プライマー溶液0.3  $\mu$ L、5  $\mu$ Mプローブ溶液0.4  $\mu$ L、鰓組織試料由来DNA溶液0.5  $\mu$ L、滅菌水3.5  $\mu$ Lからなる全量10  $\mu$ Lとした。1サンプルにつき3本立てで行い、PCR反応は、QuantStudio5 リアルタイムPCRシステム

(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて、反応条件は、両マスターミックスのマニュアルに従い、熱変性とアニール・伸長のサイクルを40回繰り返した。得られたCt値から各遺伝子のコピー数を既知の検量線で算出した。

結果

4地点のアユ*cyt b*遺伝子と菌*rpoC*遺伝子の推移

採水日の天候、4地点の水温、および濁りの有無をTable 1、4地点のアユ*cyt b*遺伝子と菌*rpoC*遺伝子の平均コピー数の推移をFig. 2に示した。

アユ*cyt b*遺伝子の推移は次のとおりであった。9月は、St.1で831~16,362 copies/L、St.2で1,055~362,011 copies/L、St.3で8,335~221,652 copies/L、St.4で1,300~182,160 copies/Lとなり、特に、St.3とSt.4のコピー数が、5日から20日まで目立って増加した。その後、4地点で急激に減少し、30日にSt.3とSt.4で再び増加がみられた。10月は、St.1で786~110,174 copies/L、St.2で1,901~293,884 copies/L、St.3で7,556~163,124 copies/L、St.4で15,016~465,489 copies/Lとなり、St.1とSt.2は、 $10^4$ ~ $10^5$ オーダーでの検出頻度が高く、St.3とSt.4は、9月と同様の増加傾向を示した。またSt.4では、25日に93,937 copies/Lまでの急激な減少がみられ、11日1日まで低値に推移した。11月は、St.1で4,378~919,423 copies/L、St.2で3,826~1,139,526 copies/L、St.3で90,544~1,816,022 copies/L、St.4で138,233~7,084,886 copies/Lとなり、 $10^6$ オーダー以上の検出頻度の最多月で、St.4が19回中15回(78.9%)、St.3が19回中5回(26.3%)、St.2が19回中3回(15.8%)、St.1が19回中2回(10.5%)の順を示し、調査期間の最高値が、19日のSt.4での7,084,886 copies/Lであった。12月は、St.1で3,873~2,209,738 copies/L、St.2で1,734~3,586,964 copies/L、St.3で15,771~4,391,469 copies/L、St.4で2,163~1,167,822 copies/Lとなり、4地点が総じて減少傾向に転じ、特に、St.1とSt.2では $10^3$ オーダー、St.3では $10^4$ オーダーまで減少したのに対し、St.4では $10^5$ オーダー間で主に推移した。また、St.4で2日に2,136 copies/Lと、急激な減少がみられた。

菌*rpoC*遺伝子は次のとおりであった。9月は、St.1で468~4,178 copies/L、St.2で685~14,878 copies/L、St.3で568~21,657 copies/L、St.4で473~6,849 copies/Lとなり、その中で、5日のSt.2とSt.3、20日のSt.3での $10^4$ オーダーの検出が目立った。10月は、St.1で450~9,133 copies/L、St.2で620~5,332 copies/L、St.3で448~7,245 copies/L、St.4で575~5,168 copies/Lとなり、9月とは違い、 $10^4$ オーダーでの検出はなかった。11月は、St.1で725~167,566 copies/L、St.2で423~21,254 copies/L、St.3で1,288~19,841 copies/L、St.4で2,532~80,082 copies/Lとなり、 $10^4$ オーダー以上の検出頻度の最多月で、St.4が19回中17回(89.5%)、St.3が19回中4回(21.1%)、St.1が19回中1回(5.3%)の順であった。また、調査期間の最高値が、28日のSt.1で示され、167,566 copies/Lであった。12月は、St.1で801~17,074 copies/L、St.2で405~9,423 copies/L、St.3で1,180~24,088 copies/L、St.4で936~21,254 copies/Lとなり、全体的な減少傾向を示しながら、中旬まで $10^4$ オーダーのコピー数が、St.1で1回、St.3で3回、St.4で5回検出された。そして、検出頻度と量ともに低下し、最後の31日はSt.3のみで検出され、1,329 copies/Lとなった。

Table 1. 4 地点の天候、水温、目視による濁りの有無。

日付	天候	水温				濁り	日付	天候	水温				濁り
		St.1	St.2	St.3	St.4				St.1	St.2	St.3	St.4	
9/4	晴	22.4	24.5	23.2	22.9		11/1	晴	18.5	18.6	18.5	16.9	
9/5	雨	21.4	21.9	20.9	21.1		11/6	晴	17.8	19.3	17.4	16.3	
9/6	晴	22.1	21.5	22.2	22.3		11/7	曇	17.5	18.2	15.9	15.1	
9/9	晴	22.3	23	23	22.4		11/8	晴	15	15	17.2	16.9	
9/10	晴	21.7	23.4	22.3	22.3		11/11	晴	17.1	16.6	16.3	16	
9/11	晴	21.7	22.4	22.4	22.6		11/12	晴	17.2	16.9	15.6	15.2	
9/12	晴	21.9	23.3	21.9	22.6		11/13	晴	16.3	15.9	15.4	15.2	
9/13	雨	21.6	22.5	22.1	22.4	有	11/14	晴	17.2	18.5	16.6	16.3	
9/17	晴	22.7	23.2	23.6	22.6		11/15	晴	15.9	14.8	13.3	13.1	
9/18	晴	23.4	23.3	24.6	22.9		11/18	雨	16	15.7	15.5	15.4	
9/19	晴	23.1	24.3	22.2	21.8		11/19	晴	15.7	15.9	15.4	15.2	
9/20	曇時々雨	22.9	22.7	21.8	21.8		11/20	晴	15	13.4	12.7	13.9	
9/24	曇	21.3	20.9	21.9	20.9	有	11/21	晴	13.4	14.2	12.3	13.9	
9/25	晴	22.2	23.2	21.3	21.4	有	11/22	雨	15.1	14.9	12.3	12.9	
9/26	曇	21.6	22.1	22.4	21.9		11/25	晴	16.3	16.1	15.3	15.9	
9/27	雨	20.8	20.9	21	21.3		11/26	曇	14.5	14.6	13.7	13.9	
9/30	晴	21.5	23.1	21.9	21.2		11/27	曇	14.8	15	14.7	14.6	
10/1	晴	24.1	24.3	22.9	23.1		11/28	雨	14.8	13.9	13.8	13.1	有
10/2	雨	22.3	22.2	21.8	20.9		11/29	晴	14.2	13.7	12.1	11.4	
10/3	大雨暴風						12/2	小雨	14.4	13.9	13.7	13.5	有
10/4	晴	23.2	22.1	22.2	21.6	有	12/3	晴	13.6	12.7	12.3	11.9	
10/7	晴	22.4	21.8	21.4	20.9		12/4	晴	14.2	13.3	12.5	13.5	
10/8	晴	22.1	21.9	21.6	21		12/5	晴	12.4	11.9	11.7	11.5	
10/9	晴	21.2	19.6	19.4	19.2		12/6	曇	12.2	11.6	10.7	10.2	
10/10	晴	20.9	19.8	19.5	19.1		12/9	晴	13.2	14.8	10.3	10.8	
10/11	曇	21.3	20.3	20.2	20.1		12/10	曇	12.3	15.1	10.9	11	
10/15	晴	20.4	19.3	18.5	18.7		12/11	晴	11.9	14.4	11	11.3	
10/16	晴	20.2	19.2	18.3	17.8		12/12	晴	12.4	14.2	10.6	11.3	
10/17	晴	20	21.8	19.8	18.6		12/13	晴	12.2	13.5	10	9.8	
10/18	曇時々雨	20.4	19.4	19.8	18		12/16	晴	11.8	14.6	10.4	10.7	
10/22	晴	19.1	20.3	18.6	18.5		12/17	曇	11.9	13.8	12.1	12.1	
10/23	晴	18.7	21.1	18.3	18.5		12/18	晴	11.8	14.7	12.7	12.8	
10/24	大雨	18.9	20.1	18.7	18.9	有	12/19	曇	11.7	13.5	11.8	11.4	
10/25	晴	19.2	21.1	19.3	19.4	有	12/20	晴	11.3	13.2	11.7	11.8	
10/26	晴	18.5	20.1	19.4	19.5		12/23	晴	11.8	12.3	9.8	9.8	
10/28	晴	19.6	19.7	18.5	18.1		12/24	晴	11.3	13.2	9.9	10.3	
10/29	雨	18.6	19.6	18.4	18.5	有	12/25	晴	11.8	12.7	9.7	10.1	
10/30	晴	19.2	20.2	17.8	17.6		12/26	雨	11.8	13.3	12.1	10.8	有
10/31	晴	18.9	19.6	17.5	16.9		12/27	晴	11	12.5	11.9	11.3	
							12/30	雨	11.6	13.4	11.2	11.3	
							12/31	晴	11.4	15.1	11.3	11.6	



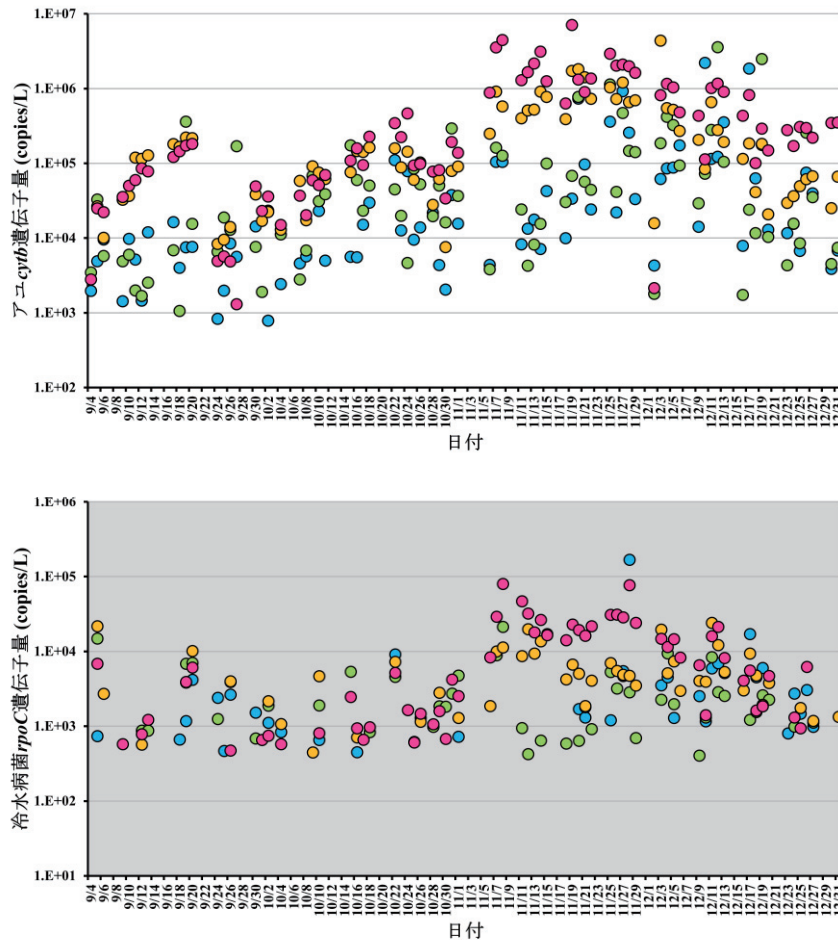


Fig. 2. qPCR法による4地点でのアユ *cyt b* 遺伝子（上）と菌 *rpoC* 遺伝子（下）の推移。各シンボルの色はFig. 1の地図上で示したものと同様。

#### 親アユと死亡親アユの由来判別

放流アユ100尾の側線上方横列鱗数計数の結果、1尾が11枚、2尾が12枚、5尾が13枚、15尾が13枚、10尾が14枚、24尾が15枚、29尾が16枚、および1尾が17枚であった（data not shown）。既往調査によると、過去に18枚の鱗数を持つ放流アユの存在も報告されているため、本研究では、18枚を不明とし、19枚以上の個体を天然アユ、17枚以下を放流アユと判別した。

親アユと死亡親アユの鱗数側線上方横列鱗数の計数結果をFig. 3に示した。まず、親アユは次のとおりであった。11月から、14日の26尾のうち、天然アユが14尾（53.8%）、放流アユが4尾（15.4%）、不明が8尾（30.8%）、20日の25尾のうち、天然アユが12尾（48%）、放流アユが7尾（28%）、不明が6尾（24%）、26日の32尾のうち、天然アユが22尾（68.8%）、放流アユが3尾（9.4%）、不明が7尾（21.9%）、12月から、3日の41尾のうち、天然アユが15尾（36.6%）、放流アユが12尾（29.3%）、不明が14尾（34.1%）、11日の24尾のうち、天然アユが11尾（45.8%）、放流アユが4尾（16.7%）、不明が9尾（37.5%）であった。次に、死亡親アユは次のとおりであった。11月から、19日の9尾のうち、天然アユが6尾（66.7%）、放流アユが2尾（22.2%）、不明が1尾（11.1%）、21日の2尾のうち、放流アユと不明が1尾ずつ（50%）、25日の11尾のうち、天然アユが8尾（72.7%）、放流アユが2尾（18.2%）、不明が1尾（9.1%）、27日の12尾のうち、天然アユが7尾（58.3%）、放流アユが4尾（33.3%）、不明が1尾（8.3%）、28日の4尾のうち、天然アユと放流アユが2尾ずつ（50%）、12月から、2日の5尾のうち、天然アユが2尾（40%）、放流アユが3尾（60%）、3日の16尾のうち、天然アユが5尾（31.3%）、放流アユが7尾（43.8%）、不明が4尾（25%）、4日の8尾のうち、天然アユが3尾（37.5%）、放流アユが2尾（25%）、不明が3尾（37.5%）、5日の9尾のうち、天然

アユが1尾 (11.1%) , 放流アユが6尾 (66.7%) , 不明が2尾 (22.2%) , 6日の16尾のうち, 天然アユが4尾 (25%) , 放流アユが7尾 (43.8%) , 不明が5尾 (31.2%) , 9日の8尾のうち, 天然アユが2尾 (25%) , 放流アユが5尾 (62.5%) , 不明が1尾 (12.5%) , 10日の11尾のうち, 天然アユが4尾 (36.4%) , 放流アユが4尾 (36.4%) , 不明が3尾 (27.3%) , 12日の11尾のうち, 天然アユが3尾 (27.3%) , 放流アユが4尾 (36.4%) , 不明が4尾 (36.4%) , 16日の6尾のうち, 天然アユが2尾 (33.3%) , 放流アユが4尾 (66.7%) , 17日の3尾のうち, 天然アユ, 放流アユ, 不明が各1尾ずつ (33.3%) , 18日の1尾は放流アユであった.

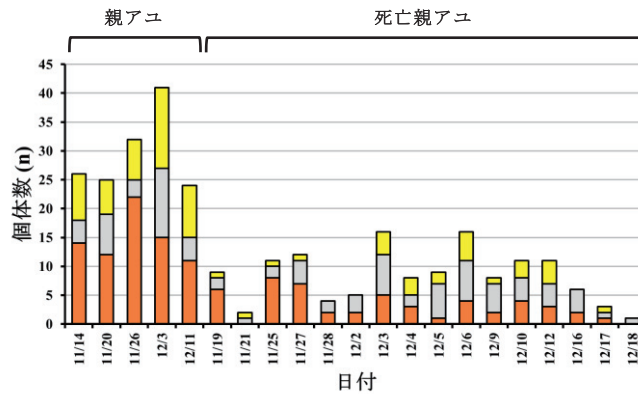


Fig. 3. 側線上方横列鱗数に基づいたSt.4の親アユと死亡親アユの由来判別. オレンジ色が天然アユ, 黄色が放流アユ, 灰色が不明.

#### 親アユと死亡親アユのGSI

親アユと死亡親アユのGSIをFig. 4に示した. まず, 親アユについて, 雌と雄はそれぞれ, 11月から, 14日で3.7~11.7, 2.8~9.6, 20日で2.5と14.3, 4.3と8.9, 26日で3.24~11.39, 2.9~8.2, 12月から, 3日で3.4~12.2, 2.7~17.8, 11日で5.4~32.4, 6.6~14.2となった. 次に, 死亡アユについて, 雌と雄はそれぞれ, 11月から, 19日で2.7~17.1, 4.0~6.7, 21日で無, 5.0と7.1, 25日で4.0と11.4, 3.8と9.1, 27日で3.4~7.6, 4.3~8.6, 28日で5.5と17.4, 5.5と16.0, 12月から, 2日で10.3, 3.8~6.1, 3日で2.5~9.5, 3.1~8.0, 4日で2.6, 2.6~10.4, 5日で2.8~4.3, 3.0~7.9, 6日で3.3~6.0, 3.4~7.3, 9日で4.2~13.5, 3.4, 10日で2.0~9.3, 2.5~3.1, 12日で2.5~6.4, 2.1~5.5, 16日で2.3~3.2, 無, 17日で1.8~6.5, 無, 18日で3.3, 無となった.

#### 親アユと死亡親アユの*F. psychrophilum*陽性率と*rpoC*遺伝子コピー数

Strepparava *et al.*<sup>7)</sup>の菌*rpoC*遺伝子を標的にしたqPCRは, 1反応あたりの検出限界が20コピーである. 各アユの陽性個体数と*rpoC*遺伝子コピー数の結果をFig. 5に示した. まず, 親アユについて, 11月から, 14日で19/26検体 (73.1%) と23~3,733 copies/50 ng総DNA, 20日で25/25検体 (100%) と196~8,419 copies/50 ng総DNA, 26日で25/32検体 (78.1%) と25~5,820 copies/50 ng総DNA, 12月から, 3日で41/41検体 (100%) と76~31,921 copies/50 ng総DNA, 11日で24/24検体 (100%) と44~52,330 copies/50 ng総DNAとなり, 経時に伴った全体のコピー数の増加傾向が示された. 次に, 死亡親アユは全て陽性となり, 11月から, 19日の9検体で29~25,483 copies/50 ng総DNA, 21日の2検体で2,306と4,532 copies/50 ng総DNA, 25日の11検体で255~45,316 copies/50 ng総DNA, 27日の12検体で33~56,410 copies/50 ng総DNA, 28日の4検体で815~1,460,166 copies/50 ng総DNA, 12月から, 2日の5検体で271~19,593 copies/50 ng総DNA, 3日の16検体で317~66,793 copies/50 ng総DNA, 4日の8検体から517~1,225,505 copies/50 ng総DNA, 5日の9検体から5,641~89,069 copies/50 ng総DNA, 6日の16検体から1,195~61,575 copies/50 ng総DNA, 9日の8検体から1,151~3663,184 copies/50 ng総DNA, 10日の11検体で960~47,049 copies/50 ng総DNA, 12日の11検体で874~106,124 copies/50

ng総DNA, 16日の6検体で2,221~20,859 copies/50 ng 総DNA, 17日の3検体で707~1,751 copies/50 ng総DNA, 18日の1検体で1,424 copies/50 ng総DNAとなった.

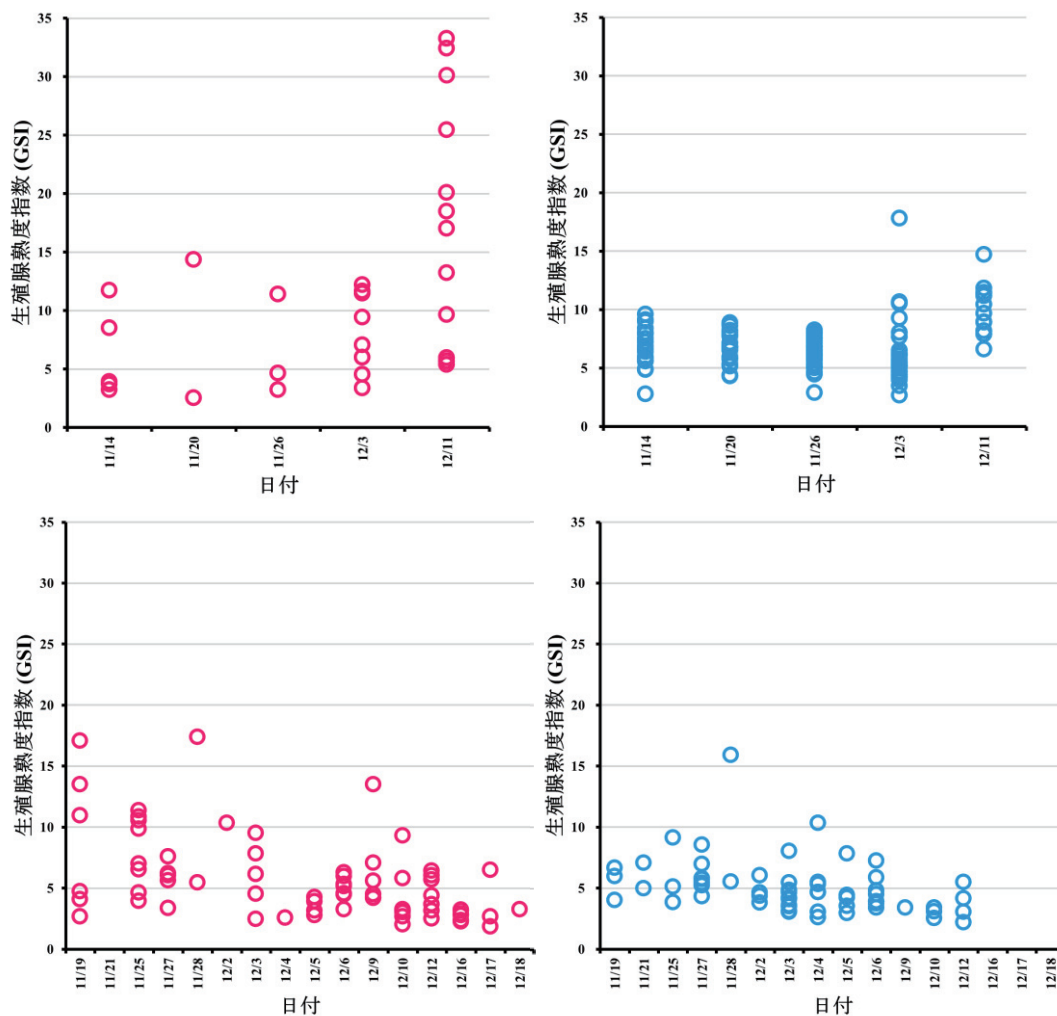


Fig. 4. St.4の親アユ（上）と死亡親アユ（下）の生殖腺熟度指数. ピンク色が雌, 青色が雄.

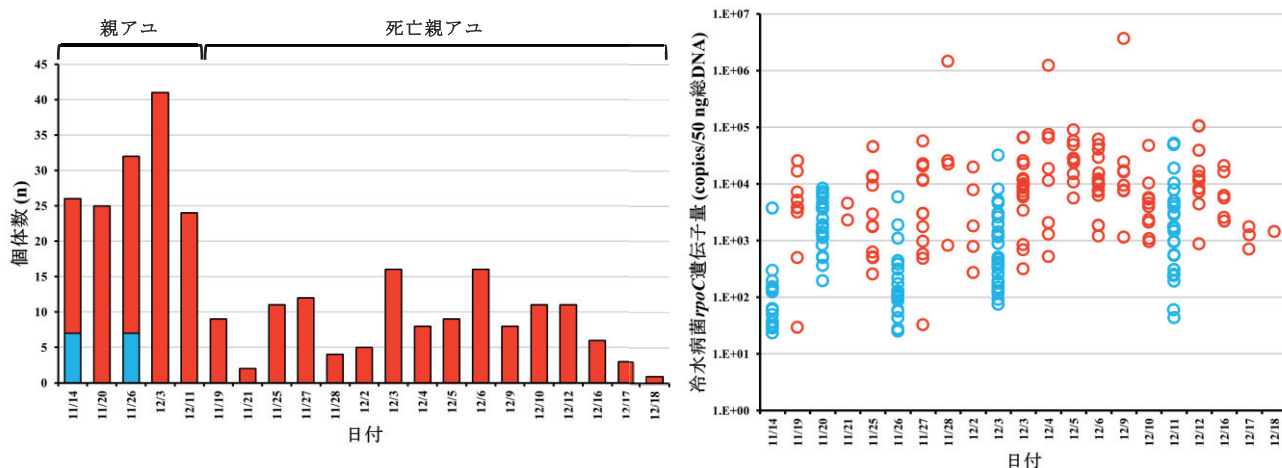


Fig. 5. qPCR法によるSt.4の親アユ由来と死亡親アユの*F. psychrophilum*陽性率（左）と菌*rpoC*遺伝子コピー数（右）  
左図の赤色が陽性個体, 水色が陰性個体, 右図の水色が親アユ, 赤色が死亡親アユ.

## 考察

本研究では、河川水中のアユ環境DNAから、物部川下流域におけるアユの資源推定を初めて試み、産卵のための親アユの流下・集積と思われる様子を、遺伝子レベルで相対的に示すことができた。その傾向の中から、特筆すべき点が2点あった。1点目は、アユ環境DNA量の増減と濁水間に相関関係が認められたことである。すなわち、9月24日、10月24日、および12月2日に、各地点で濁水の発生が確認され、同時にアユ環境DNAの急激な減少もみられた。このことから、濁水発生時にアユがその場からいなくなる忌避行動があったと推測した。河川の濁水は、様々な魚類に対して負の影響を及ぼす (Merle<sup>9)</sup>)。アユの場合、高濃度の濁水に暴露させると、短時間で致死するものが多かったとされ (村岡と角<sup>10)</sup>)、さらに、高濃度曝露によるアユの生存率は、粒子サイズが大きく影響することが定量的に示されている (村岡ほか<sup>11)</sup>)。また、低濃度でも、濁水と清水の水槽を用いた選択実験から、アユは濁水を選択しなくなるとの報告がある (本田<sup>12)</sup>; 藤原<sup>13)</sup>)。しかし、その一方で、実際の野外において、アユの濁水による忌避行動が観察された事例はまだ少なく、議論は残る。その一例として、短期間での低濃度濁水暴露下で、アユは数百メートルの河川区間から即座に移出しなかったことが、野外実験から証明されている (加藤ほか<sup>14)</sup>)。また今回、濁水発生時にアユ環境DNA量が急激に減少したのは、もしかすると、これまでに指摘された濁水によるDNA損失に起因したことも否定できない (永田と江口<sup>15)</sup>)。物部川は、ダムによる濁水問題が極めて深刻な状況で、引き続き、濁水の粒径分布や発生時間にも注目して、それらの条件下でのアユ忌避行動の有無を調べていく必要がある。

2点目は、河川水からの*F. psychrophilum*の検出頻度の高さと菌量の多さが、11月のSt.4で顕著に目立っていたことである。同地点は、毎年人工産卵場が造成される場所であり、おそらく、その期間、産卵活動が活発に行われていたことは、アユ環境DNA量の推移からも容易に想像された。河川水から菌が常に検出されるには、排菌者の存在が必須である。アユは、成熟が進むにつれて、*F. psychrophilum*に対する免疫応答が低下することが分かっている (Minami *et al.*<sup>16)</sup>)。仮に、保菌状態の親アユが、流下の過程で排菌していたとすると、9月から11月までの各地点の菌分布は、そうした状況を反映していたと想定される。さらに、この仮説が成立すれば、菌数の最も多い場所は、親アユが大量集積して産卵活動を行う産卵場、つまりSt.4となるはずで、本研究の結果とも相違がなく一致する。また、感染アユからの排菌量は、死亡前よりも死亡後に増加することが知られ (大原ほか<sup>17)</sup>)、実際に、St.4の死亡親アユは全て*F. psychrophilum*陽性で、かつ一部の検出は高菌量であったことも、St.4での目立った菌検出に大きく寄与したと考えられた。

河川水から検出された*F. psychrophilum*の感染性について、死菌と生菌の両方を含むとされ、生理活性の低下した培養不能菌検出による過大評価が指摘されている (永田と江口<sup>15)</sup>)。この点は水温が深く関与すると考える。*F. psychrophilum*は、通常環境水等の飢餓条件下では、どの温度でも増殖することができず、22°Cから27°Cで2日から7日以内、28°Cで2日以内にコロニー形成能を失う (Sugahara *et al.*<sup>18)</sup>)。その一方で、本研究での期間中の水温域でもあった低水温の場合、フィルターとオートクレーブによる滅菌湖試水中で、コロニー形成能を有する生菌は5°Cで56日間、15°Cで300日間存在できる (Madetoja *et al.*<sup>19)</sup>)。また、フィルターによる滅菌河川試水中でも、14°Cで19週間後まで生菌が存在する (Vatsos *et al.*<sup>20)</sup>)。11月の水温推移をみると、いずれも*F. psychrophilum*の至適水温域で推移しており、排菌の感染性は失われることなく、それらを感染源とした感染拡大が起きた可能性は十分にある。しかし、生息密度の最も高いSt.4の親アユのほとんどは、11月中旬の調査開始時、既に高率保菌の状態にあり、産卵場内での感染拡大の有無を明らかにできなかった。今後、採捕の場所、期間、尾数を再検討した上、継続調査を予定している。

物部川下流域では、10月1日より産卵親アユ保護区域が設けられ、10月下旬には、産卵可能なアユが産卵場内に出現する (高知県内水面漁業センター<sup>21)</sup>, <sup>23)</sup>)。アユは、一般的に雌よりも雄の成熟が早く (白石と武田<sup>22)</sup>)、以前の報告から、同保護区域での親アユの平均生殖腺成熟度は、10月30日に雌が7.2と雄が14.4、11月18日に雌が14.2と雄が8.5、12月4日に雌が10.0と雄が7.2、12月25日に雌が6.9と雄が4.1で、それらの推移は例年通りとされた (高知県



内水面漁業センター<sup>23)</sup>）。St.4の親アユは、雌雄ともに11月よりも12月での高値が目立ち、その中での最高値が、雌で12月11日の33.3、雄で12月3日の17.8となり、前述した傾向とは必ずしも合致するものでなかった。また、それら高値を示したアユは、産卵の至適水温14～19℃を鑑みて（松原<sup>24)</sup>）、12月に入り14℃を下回る水温条件下、放精・放卵を終えられなかった可能性がある。そして興味深いのは、未放精と未放卵の疑いがある個体は死亡親アユからもみつき、それらが*F. psychrophilum*に感染していた点にある。おそらく、この場合の死因は、外観所見から冷水病本来の貧血死ではなく、全身に大量の菌が回って生じる敗血症によることが疑われた。今後、同死亡リスクも含め、実際、親アユの産卵効率がどの程度低下するのかを調べていく必要があり、流下親アユ、特に雌の保菌実態を詳細に把握することで、雌1尾が持つ卵の粒数をあわせて、*F. psychrophilum*感染による流下仔魚の損失を試算できると考える。

以上、本研究より、冷水病問題の観点から、物部川のアユ資源保全について検討すべき重要な知見を得ることができ、各関係者とその対応について早急に協議しなければならない。

### 謝辞

本研究のアユ特別採捕に関して、物部川漁協協同組合の皆様のご協力に深く感謝申し上げます。本研究の一部は、令和2年度自然科学系（農学部門）個人・グループ研究プロジェクトの助成を受けて行われたものである。

### 参考文献

- 1) 国土交通省 (2021) 河川データブック 2021. 参照先: [https://www.mlit.go.jp/river/toukei\\_chousa/kasen\\_db/pdf/2021/4-1-4.pdf](https://www.mlit.go.jp/river/toukei_chousa/kasen_db/pdf/2021/4-1-4.pdf).
- 2) 門田章宏・石本千春・中野晋・鈴木幸一 (2008) 物部川河口部の閉塞要因と河口砂州の形成・破壊に関する解析. 水工学論文集, 52, 601–609.
- 3) 物部川漁業協同組合 (2006) 物部川 史上最悪の危機の克服をめざして. 物部川漁協協同組合, pp.1–66.
- 4) 小畑博貴・渡邊法美 (2008) 物部川流域の人々の川へのまなざしの変遷に関する基礎的考察. 建設マネジメント研究論文集, 15, 441–452.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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 Microbiology, 14:105.
- 8) Yamanaka, H. and T. Minamoto (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. Ecological Indicators, 62, 147–153.
- 9) Merle, G. (2000) Some environmental aspects of flushing. International workshop and symposium. 195–202.
- 10) 村岡敬子・角哲也 (1998) 高濃度の濁りがアユに与える影響について. 土木学会関東支部年次学術講演概要集, 6, 1048–1049.
- 11) 村岡敬子・天野邦彦・土居隆秀・久保田仁志・三輪準二 (2011) 高濃度濁水下におけるアユの生存率と懸濁物質の粒度組成の関係魚類学雑誌, 58, 141–151.
- 12) 本田晴朗 (1983) アユの遡上行動におよぼす濁りおよび水温低下の影響. 海洋科学, 15, 223–225.
- 13) 藤原公一 (1997) 濁水が琵琶湖やその周辺河川に生息する魚類へ及ぼす影響. 滋賀県水産試験場研究報告, 46, 9–37.
- 14) 加藤康充・小野田幸生・森照貴・萱場祐一 (2015) 河川での低濃度濁水の発生に対するアユの反応事例: 野外

- における河川区間スケールでの実験. 応用生態工学, 18, 155–164.
- 15) 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.
  - 16) 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 Immunology, 76, 167–173.
  - 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) qPCR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.
  - 18) 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 Pathology, 45, 58–65.
  - 19) Madetaja, J., S. Nystedt and T. Wiklund (2003) Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. FEMS Microbiology Ecology, 43, 217–223.
  - 20) Vatsos, I. N., K. D. Thompson and A. Adams (2003) Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. Diseases of Aquatic Organisms, 56, 115–126.
  - 21) 高知県内水面漁業センター (2015) 土佐湾産天然アユ回復のための新たな保護増殖手法の開発. 平成25年度高知県内水面漁業センター事業報告書, 24, 9–15.
  - 22) 白石芳一・武田達也 (1961) アユの成熟に及ぼす光周期の影響. 淡水区水産研究所研究報告, 11, 69–84.
  - 23) 高知県内水面漁業センター (2016) 土佐湾産天然アユ回復のための新たな保護増殖手法の開発. 平成 26 年度事業報告書, 25, 9–15.
  - 24) 松原喜代松 (1965) アユ, 魚類学 (下). 恒星社厚正閣, 東京, pp.494–505.

令和3年(2021)10月22日受理

令和3年(2021)12月31日発行