

## 十勝地方の小河川における ニホンザリガニ感染症 *Aphanomyces astaci* の出現

山田 昌義<sup>1)</sup>・川井 唯史<sup>2)</sup>

### Occurrence of the crayfish plague *Aphanomyces astaci* on the endangered freshwater crayfish *Cambaroides japonicus* in small rivers in the Tokachi region, eastern Hokkaido, Japan

Masayoshi YAMADA<sup>1)</sup>, Tadashi KAWAI<sup>2)</sup>

#### はじめに

北海道東部の十勝地方には、日本固有の希少種ニホンザリガニ *Cambaroides japonicus* (De Haan 1841) が生息し (Kawai and Fitzpatrick 2004) 保全が必要とされている。当地域には北米原産のウチダザリガニ *Pacifastacus leniusculus* (Dana 1852) およびアメリカザリガニ *Procambarus clarkii* (Girard 1852) も生息しており (川井ほか 2000)、これら2種は主にザリガニ類が感染する水カビ病と称される病気の媒介者であることが疑われていた (石田 1982)。最近の遺伝子解析技術の発達に伴い、北海道に分布する外来ザリガニ類は水カビ病の原因菌である *Aphanomyces astaci* を約50%の割合で保菌していることが示された (Mrugalara et al. 2016, Kamimura and Kawai 2020)。北米産のザリガニ類は水カビ病の原因菌に感染しても耐性が強く致死に至ることは少ないが、欧州で実施された室内試験によるとニホンザリガニなど北米産以外のザリガニ類が水カビ病に感染すると短い期間で100%近い致死率を示した (Unestam 1969, 1972)。野外での実例として、北海道札幌市ではアメリカザリガニ由来の水カビ病が原因で死滅した個体群があり (Martin-Torrijos et al. 2018) 外来ザリガニ類は保全の必要が高い在来ザリガニが感染すると致死の可能性が高い危険な感染症の媒介者であることが明らかである。国外ではアメリカザリガニが欧州在来のザリガニ類における水カビ病の媒介者であることも報告され、在来ザリガニの大

量死滅を引き起こしている (Diéguez-Uribeondo and Söderhäll 1993)。

水カビ病の原因となる *A. astaci* は卵菌類の一種であり、水中でのみ生存できる胞子で増殖し、この胞子がザリガニ類の体表に付着すると、宿主の体内に菌糸を進展させ、菌糸の先端に胞子嚢が形成され、ここから胞子が水中に放出される生活環を送る (漆原・川井 2021)。そのため、宿主となる外来ザリガニを採集しなくても、水中における *A. astaci* の胞子の出現状況を把握できれば、本菌の出現状況についての知見が得られる。ただし、菌の胞子は水中に存在するが肉眼では見えない微細なものである。そのため本研究では、胞子の出現が想定される水系で採水を行い、その試水の遺伝子解析で出現の有無を判定する環境DNAの技術を活用した。環境DNAを利用した希少生物の出現の有無はニホンザリガニでも活用されたことがある (Ikeda et al. 2016, 2019)。本研究では、十勝地方の一河川において、*A. astaci* の胞子の出現の季節変化、流れ分布の把握ができたので報告する。

#### 調査方法

調査は2021年、5月18日、7月19日、9月6日および11月16日の合計4回実施した。調査した水系は、十勝川に流入する支流群である。希少種の生息場所を乱獲から保護する観点で正確な場所を示さないが、環境DNA分析用の試水を採水する地点を模式的に図1に示した。調査地点は、小河川Aで5地点(A-1

1) 株式会社ズコーシャ 〒080-0048 帯広市西18北1-17  
Zukosha Co., Ltd., 18 West, 1-17 North, Obihiro, 080-0048 Hokkaido, Japan  
2) 〒046-0003 北海道余市町  
Yoichi, 046-0003 Hokkaido, Japan

～5), 小河川 A の下流域に流入する支流で 2 地点 (B-1～2), 小河川 A の上流域の湧水起点部で 1 地点 (C-1), 小河川 A が合流して十勝川に流入する支流の河川で 1 地点 (D-1) の合計 9 地点とした。小河川 A では, 2015 年 6 月には 20 分で 2 名の採集者が 130 個体以上のニホンザリガニを得ていた。しかし, その後一年間で消滅し, その後はニホンザリガニが最も得られやすくなる夏季に調査を試みても得られておらず (以下, 消失した, と略す) 水カビ病の発生が疑われている。小河川 A に流入する湧水起点部 (C) と小河川 A の支流 (B) には 2021 年現在もニホンザリガニの分布が確認でき, 小河川 A が合流する十勝川の支流 (D) では外来と在来のザリガニ類の分布記録は無い。各採水地点の間隔は清野ら (2020) を参考に約 500m とした。調査時期の間隔については, 既往の報告 (Turner et al. 2015) を参考に約 2 ヶ月毎とし, 採水日は採水作業に伴う底質の巻き上げが生じやすい降雨時および降雨直後を避けた。

採水は, *A. astaci* の混入防止のため, マスクおよびゴム手袋を着用した上で, 新品の容器で行った (図 2)。また, 胴長などの水域内に入る可能性がある資材については, 採水前に次亜塩素酸ナトリウムを含む塩素系漂白剤で DNA の除染を行った。採水は, 浮遊物を混入させないようにしながら, 対象水域に採水容器を沈めて行った。ただし, 水深が浅く, 採水容器を沈めると底質を巻き上げる可能性があった場合には, 使い捨てのプラスチックカップを用いて採水し, 採水容器へ

と移し替えた。採水量は 1 L とし, 採水後転倒混和した。なお, 容器には 9 割程度に試水を入れた。採水容器は, ペーパータオルで拭き取ったのち, チャック付きのポリ袋に入れ, 保冷して実験室に持ち帰った。同一河川における採水は, 下流地点から上流地点の順に行った。

小河川 A の最下流地点 (A-1), 中間地点 (A-3) および最上流地点 (A-5) では, 小型絶対圧水位計 (応用地質 (株), S&DL mini) で水温を 1 時間間隔で自動記録した。

採取した試料は速やかにろ過した。ろ過に用いるフィルターは厚さ 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルター (ADVANTEC, ポリカーボネートタイプ) とした。ろ過したフィルターに Lysis Soluton F (ニッポンジーン) を添加した後, Shake Master Neo (BMS) を用いて, 1,500 rpm で 2 分間破碎した。破碎したサンプルは, 65°C で 10 分間静置した後, 12,000  $\times g$  で 1 分間遠心分離を行い, 上清を分取した。MPure-12 システムおよび Mpure Bacterial DNA Extraction Kit (MP bio) を用いて, 分取した溶液から DNA を精製した。DNA 濃度は, QuantiFluor dsDNA System (Promega) を用い, Synergy LX (Bio tek) で測定した。

分析は 3 系統行い, 1. 解析対象サンプル, 2. 陽性の指標となるサンプル, 3. 陰性を示すサンプルで, リアルタイム PCR による種特異的解析を行った (高原ほか 2016, 山中ほか 2016)。増幅のためのプライマーとプローブは, Vrålstad et al. (2009) に基づいた。解

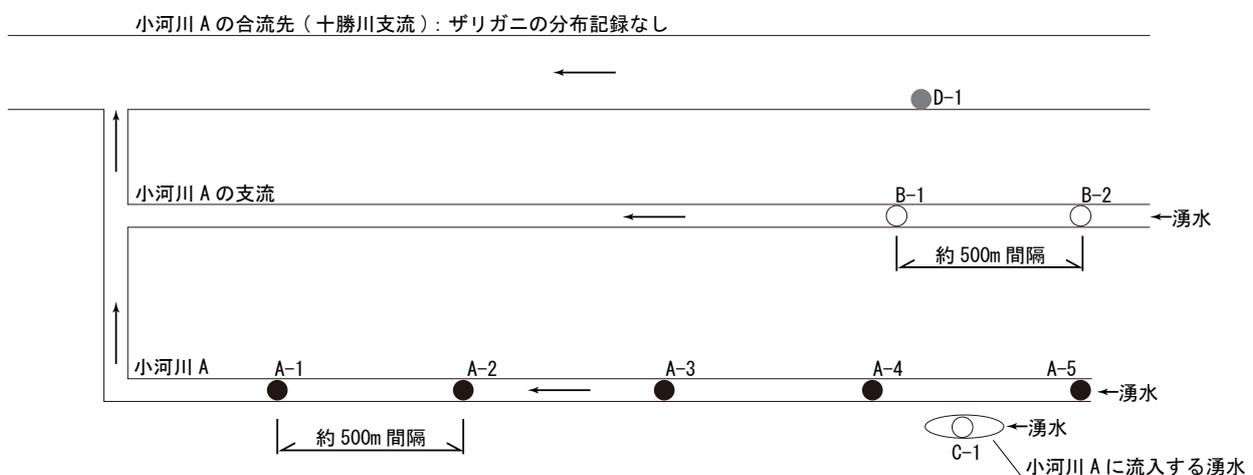


図 1 調査地点の模式図。

黒丸はニホンザリガニが消失した地点, 白丸は現在もニホンザリガニが生息する地点, 灰色の丸はニホンザリガニと外来ザリガニの分布記録が無い地点を表す。



図2 採水方法

## (a) コンタミネーションの防止（準備）

- ・長靴等の除染（塩素系漂白剤）
- ・マスク・ゴム手袋の着用
- ・新品容器の使用

## (b) 採水作業時の留意事項

- ・底質を巻き上げない  
（水深が浅い場合はプラスチックコップを使用）
- ・浮遊物を混入させない

## (c) 作業の流れに関する留意事項

- ・下流地点⇒上流地点の順に実施
- ・容器はチャック付きポリ袋に入れ、保冷剤で冷やして運搬

析の反復数は8とした。陽性か陰性の判別は、ポリメラーゼ連鎖反応の過程で消光物質が働かなくなることにより検出される蛍光強度の増幅傾向が陰性を示すサンプルとは明らかに異なり、陽性のサンプルと同様に指数関数的に増幅した場合を陽性（図3a）、蛍光強度が微増して陰性サンプルと同様な場合を陰性とした（図3b）。なお、蛍光強度の増幅はみられるが、PCR阻害物質等の影響で増幅が指数関数的ではない場合には、陰性対照における最終的な蛍光強度と比較し、蛍光強度が陰性対照よりも高い（+0.04）ものを陽性、同程度（±0.03）かそれ以下のものを陰性と判定した。ただし8反復中の全てが陰性または陽性を示さず、一部が陰性で残りが陽性の場合については、反復8のうち1反復でも陽性を示すものがあれば、この試水は水カビ病の胞子を検出したと判断し、8反復全てが陰性の場合には当該地点では未検出と判断した。

## 結果と考察

ニホンザリガニが消失した区間Aのうち、最下流のA-1、中間地点のA-3および最上流のA-5の水温の推移を図4に示した。A-1およびA-3では5月から8月頃まで月平均水温が上昇し、9月以降には低下した。しかし、A-5では水系の起点部である湧水の影響を強く受けており、水温が比較的一定していた。

9月の採水では、全地点で水カビ病の胞子が検出された（表1）。これは、調査対象の全水域において、*A. astaci* が出現することを示している。本調査水系では外来ザリガニ類が見られないため、水カビ病の原因菌の胞子は宿主である外来ザリガニ類が生息しなくて

も出現することが明らかである。なお北海道札幌市では外来ザリガニ類が存在しないにも関わらず水カビ病が発症して死滅したニホンザリガニ個体群があり（Martin-Torrijos et al. 2018）、本結果と同じであった。小河川Aでは過去にニホンザリガニが分布していたが、外来ザリガニ類の侵入が無い状況であったにもかかわらず、在来種の個体群が消失した。その原因として、水カビ病の可能性が疑われていたが、本研究により、その可能性はより高まった。検出した *A. astaci* の起源は不明だが、十勝川支流から胞子が遡上した可能性は考えにくいことから、水カビ病によるニホンザリガニの大量死滅が発生した以降も残留している可能性と、*A. astaci* の胞子を含む十勝川支流の水が伏流水などの形で侵入している可能性が考えられる。またニホンザリガニが生息している小河川Aの支流でも *A. astaci* の胞子が検出されていることから、胞子が出現することにより、必ず水カビ病が発症してニホンザリガニの大量死滅に結びつく訳では無いものと考えられる。

水温の推移と検出数の関係を見ると、最上流部は湧水の影響で月別の変化があまり明確では無いが、中間と最下流は水温が最も低い2月から8月にかけて昇温し、9月に最高平均水温を記録し、その後は11月にかけて降温している（図4）。検出反復数の割合は各地点において9月が最も高かった（図5）。本研究の調査月では、各地点の平均水温が最も低いのが5月、次が11月、その次が7月となっており（図4）、全体の検出地点数も同じく最も低いのが5月、次が11月、その次が7月となっている。そのため、水温と検出

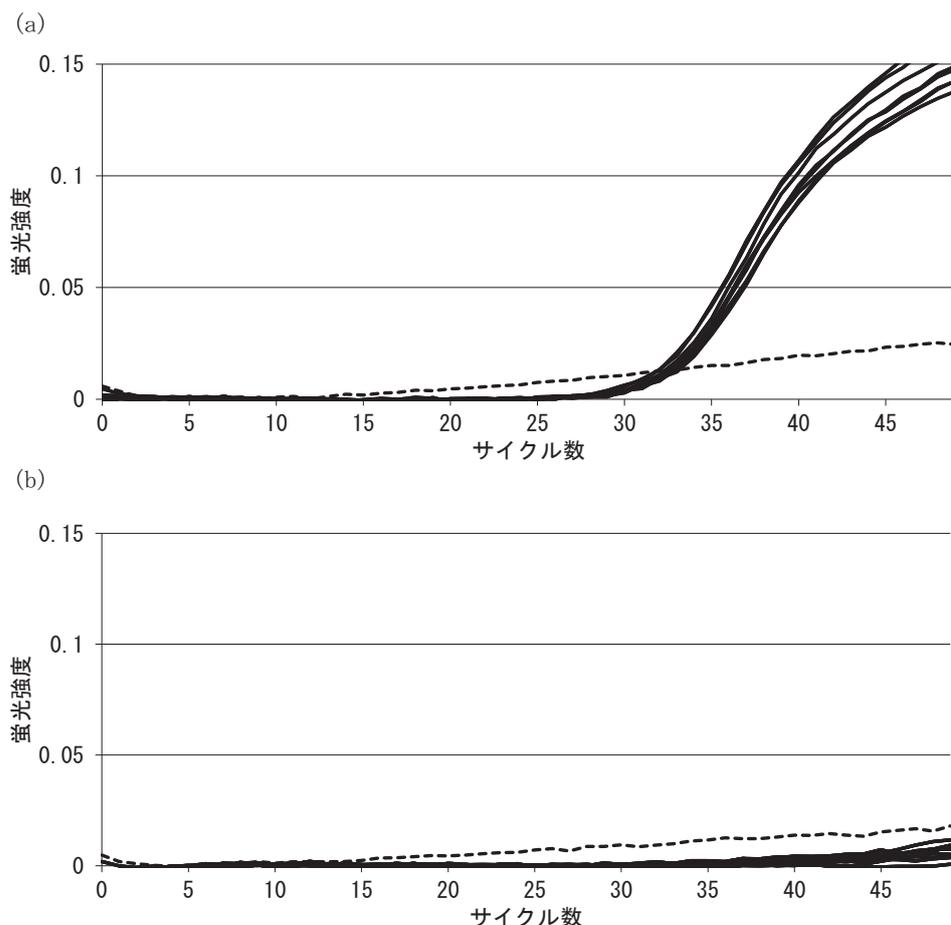


図3 陽性・陰性の判別。  
(a)は陽性、(b)は陰性を表す。図中の実線は調査サンプルの増幅曲線、点線は陰性対照を表す。縦軸はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の結果、消光物質の作用が働かなくなることにより検出される蛍光強度を表す。横軸はPCRにおけるDNAの合成回数(サイクル数)。

表1 採水時の水温と環境DNA分析結果。

最も濃い網掛けの地点(A)はニホンザリガニが消失した区間、最も薄い網掛けの地点(BとC)は2021年現在もニホンザリガニが生息する区間、それ以外の地点(D)はザリガニと外来ザリガニの分布記録が無い箇所を表す。環境DNA分析結果の+は検出、-は未検出を表す。括弧内の数字は8反復のうち*A. astaci*のDNA陽性の反復数を表す(検出数/反復数8)。地点名の位置および水域の位置関係は図3に示す。

地点名	環境DNA分析結果			
	5	7	9	11(月)
A-1	- (0/8)	+ (8/8)	+ (8/8)	+ (8/8)
A-2	- (0/8)	+ (8/8)	+ (7/8)	- (0/8)
A-3	- (0/8)	+ (1/8)	+ (1/8)	- (0/8)
A-4	+ (1/8)	- (0/8)	+ (1/8)	- (0/8)
A-5	- (0/8)	- (0/8)	+ (2/8)	- (0/8)
B-1	- (0/8)	+ (1/8)	+ (8/8)	- (0/8)
B-2	- (0/8)	+ (4/8)	+ (8/8)	+ (1/8)
C-1	- (0/8)	- (0/8)	+ (1/8)	- (0/8)
D-1	- (0/8)	+ (8/8)	+ (8/8)	+ (8/8)
検出地点数	1地点	6地点	9地点	3地点

数の高低は同調していると考えられる。オオサンショウウオ *Andrias japonicus* を対象とした野外調査事例によると、年4回の調査を行った結果、冬にもっとも

環境中のDNAの検出率が高いことが明らかになっている(Fukumoto et. al. 2015)。この結果について高原ら(2016)は、水温が低い方が環境中の微生物などによるDNAの分解が遅くなり、それによって環境中のDNAの検出率が高くなったと考察している。本研究では水温が比較的低くDNAの検出率が高まることが想定される5月と11月で検出率が低いことから、水温の高い7月と9月に急激に*A. astaci*の胞子が放出された可能性が考えられる。今後、*A. astaci*の胞子の有無を環境DNAで検査する場合は、年間で最も昇温する時期に実施することが合理的と考えられる。また、ザリガニの保全を目的として移植などの対策を講じる場合、ザリガニへのリスクが最も低い時期を選択することが望ましいので、水温が高い時期は避けることが望ましい。

ニホンザリガニが消失した区間における*A. astaci*検出反復数の流程による変化をみると、下流側ほど高くなる傾向があった(図6)。本研究の対象水域は、年間を通して水温が安定している湧水に起源を有し、その影響が強いため、上流域では年間を通して水温の変

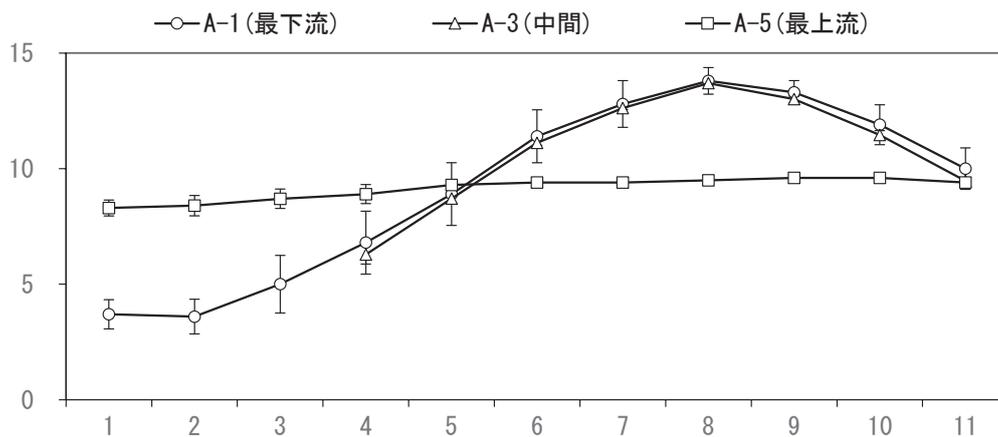


図4 ニホンザリガニが消失した区間の月平均水温の推移。  
縦軸は月平均水温 (°C), 各プロットの縦棒は標準偏差を表す. A-1, A-3 および A-5 の位置は図1に示した. A-3 では, 1月~3月の水温データが0°Cを下回っていたことから, 結氷していたと判断して除外した.

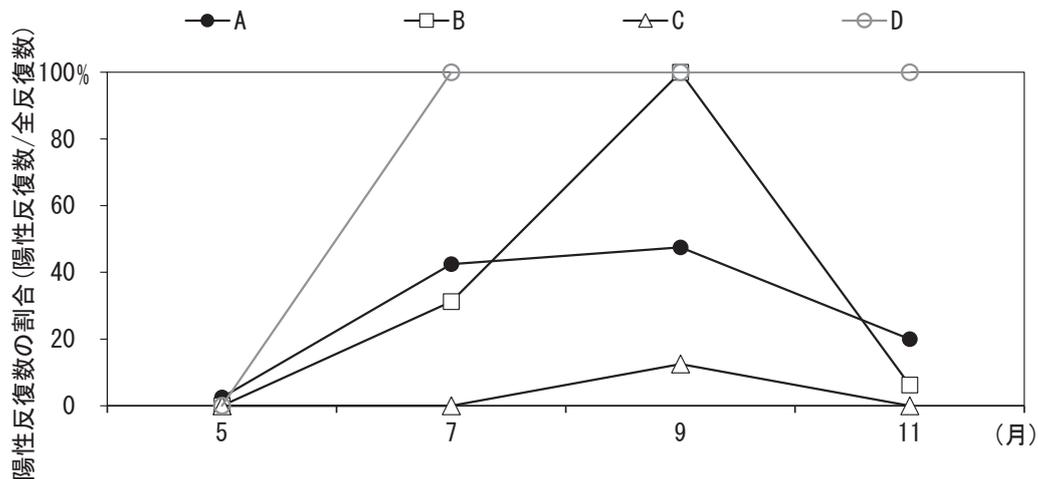


図5 各区間における *A. astaci* DNA 陽性反復数の割合の推移。  
ニホンザリガニが消失した区間 (A) は黒丸, ニホンザリガニが 2021 年現在生存する区間 (B と C) は白抜き四角と三角, ニホンザリガニと外来ザリガニ類の生息情報が無い区間 (D) は灰色の白抜き丸. 区間の位置は図1に示した. 陽性反復数の割合は, 陽性反復数 / 全反復数 (8) × 100, (%) とした.

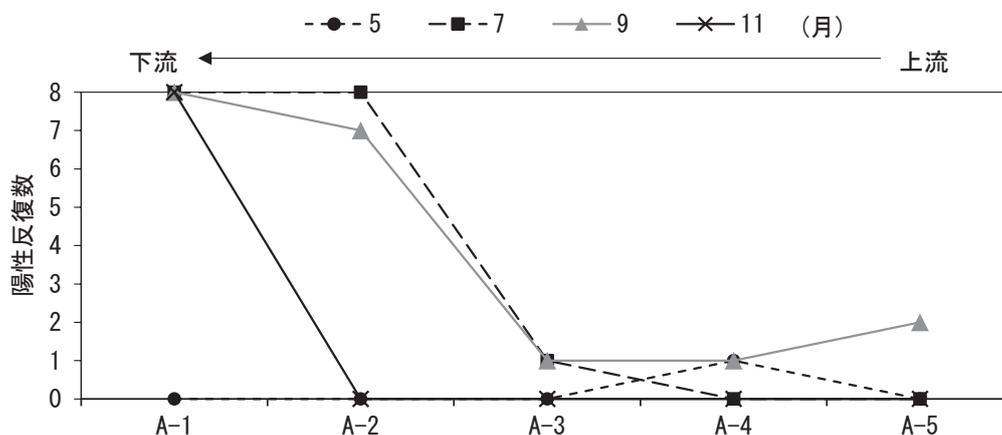


図6 ニホンザリガニが消失した区間 (A) における *A. astaci* 陽性反復数の流れによる違い. A-1 ~ 5 の位置は図1に示した.

化が小さく、下流域にいくほど気温や日射の影響を受けて水温が変化しやすい傾向があると考えられる。このことから、下流域では、水温の上昇に伴い *A. astaci* 胞子の放出量が増加したことで、検出が多くなった可能性がある。その他の可能性として *A. astaci* の胞子は、河川の流れを遡るほどの移動能力は無いことから（漆原・川井 2021）、流下に伴って胞子の量が増大していき、結果として下流域で濃度が高くなることが考えられる。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたり、環境 DNA を使った水カビ病の検出方法について情報を頂いた株式会社パシフィックコンサルタンツの池田幸資博士に深謝します。

#### 引用文献

- Diéguez-Urbeondo, J. and Söderhäll, K., 1993. *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management*, **24**: 761–765.
- Fukumoto, S., Ushimaru, A. and Minamoto, T., 2015. A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, **52**: 358–365.
- 石田昭夫, 1982. ヒメマス・ザリガニ・プランクトン—日本生態学会シンポジウム講演要旨. 北方林業, **34**(1), 10–14.
- Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T. and Negishi, J., 2016. Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources*, **8**(3), DOI: 10.1007/s12686-016-0541-z.
- Ikeda, K., Doi, H., Terui, S., Kato, A., Mitsuzuka, T., Kawai, T. and Negishi, K., 2019. Estimating native and invasive crayfish distributions in relation to culvert barriers with environmental DNA. *Freshwater Science*, **38**(3), DOI: /10.1086/704998.
- Kamimura, K. and Kawai, T., 2020. Prevalence of the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora, in alien crayfish species in Japan. *Freshwater Crayfish*, **25**: 31–37.
- Kawai, T. and Fitzpatrick, J.F.Jr., 2004. Redescription of *Cambaroides japonicus* (De Haan, 1841) (Crustacea: Decapoda: Cambaridae) with allocation of a type locality and month of collection of types. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **117**(1): 23–34.
- 川井唯史・中田和義・平田昌克・音更川グラウンドワーク研究会, 2000. 十勝中部におけるザリガニ類の分布. 帯広百年記念館研究紀要, **18**: 1–8.
- Martin-Torrijos, L., Kawai, T., Makkonen, J., Jussila, J., Kokko, H., and Dieguez-Urbeondo, J., 2018. Crayfish plague in Japan: a real threat to the endemic *Cambaroides japonicus*. *PLOS ONE*, **13**(4), e0195353.
- Mrugala, A., Kawai, T., Kozubikova-Balcarova, E. and Petrusek, A., 2016. *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquatic Conservation, Marine and Freshwater Ecosystem*, **27**(1): 103–114.
- 清野聡子・源 利文, 2020. 調査地点の設定. 環境 DNA 学会 環境 DNA 技術標準化委員会 (編), 「環境 DNA 調査・実験マニュアル Ver 2.2.」, 6–11. ([https://ednasociety.org/wp/wp-content/uploads/2020/09/eDNA\\_manual\\_ver2\\_2\\_1.pdf](https://ednasociety.org/wp/wp-content/uploads/2020/09/eDNA_manual_ver2_2_1.pdf)) (2022 年 1 月 31 日ダウンロード).
- 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して～. 日本生態学会誌, **66**: 583–599.
- Turner, C.R., Uy, K.L. and Everhart, R.C., 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, **183**: 93–102.
- Unestam, T., 1969. Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report Institute of the Freshwater Research, Drottingholm*, **49**: 202–209.
- Unestam, T., 1972. On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Report Institute of the Freshwater Research, Drottingholm*, **52**: 192–198.
- 漆原 強・川井唯史, 2021. ザリガニ類の水カビ病 (総説). 青森自然誌研究会誌, **26**: 79–83.
- Vrålstad, T., Knutsen, A.K., Tengs, T. and Holst-Jensen, A., 2009. A quantitative TaqMan® MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, **137**: 146–155.
- 山中弘樹・源 利文・高原輝彦・内井喜美子・土居秀幸, 2016. 環境 DNA 分析の野外調査への展開. 日本生態学会誌, **66**: 601–611.