

高知県鏡川下流域トリム堰，廓中堰，ならびに朝倉堰周辺の 遡上アユにおけるフラボバクテリウム・サイクロフィラム感染リスク評価

今城雅之¹・山下はづき²・片岡榮彦³・大崎靖夫³・高橋徹³

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

Risk Assessment of *Flavobacterium pschrophilum* Infection in Upstream Migrating Ayu

Around the Torimu, the Kachu and the Asakura Weirs in the Lower Reaches of the Kagami River, Kochi Prefecture

Masayuki Imajoh¹, Hazuki Yamashita², Shigehiko Kataoka³, Yasuo Osaki³ and Toru Takahashi³

¹ Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; ² Graduate School of Integrated Arts and Science, Kochi University; ³ Kagamigawa Fisheries Cooperative Associations

Abstract: Ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) is a popular target for angling using the Japanese fishing method known as tomozuri. The Kagami River is located in the central Kochi Prefecture on Shikoku Island in Japan and is 31 km long. Bacterial cold-water disease (BCWD), which is caused by *Flavobacterium pschrophilum*, has affected ayu populations in lakes and rivers across Japan since the mid-1990s. This disease most frequently occurs from May to July at water temperatures of 14 to 21°C. Five weirs building in the lower reaches of the river have potential to impede ayu passage upstream and downstream. In this study, we assessed the risk of *Flavobacterium pschrophilum* infection in upstream migrating ayu around the Torimu, the Kachu and the Asakura Weirs.

キーワード：鏡川，トリム堰，廓中堰，朝倉堰，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.

Keyword: Kagami River, Torimu Weir, Kachu Weir, Asakura Weir, Ayu, Bacterial cold disease, *Flavobacterium pschrophilum*.

はじめに

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) は高知県内河川の有用魚種で、本県にもたらす経済効果は漁業で 9.1 億円、遊漁で 1.7 億円と 10 億円以上の価値が算出されている (占部, 2020). 鏡川は全長 31.1 km, 流域面積 170 km² の市街地を流れる二級河川でありながら、アユ釣り, 特に高い人気の友釣りを楽しむ遊漁者が毎年多く訪れ, その遊漁料収入は資源増殖や河川管理等の事業を行うための重要な財源になっている.

鏡大利には洪水調節, 各種用水の供給, 発電と多目的を持つ鏡ダムが設けられ, 鏡ダム下流の本川, および支川の吉原川と的淵川では, 毎年浦戸湾から天然アユの遡上が見られる. その推定生息尾数は漁獲量最盛期の 1975 年には 126 万尾であったが (岡村ほか, 1976), その後は減少して, 2006 年から 2019 年は 8 万尾から 40.8 万尾と低調で推移している (西日本科学技術研究所, 2020). こうしたアユ資源減少から資源の回復・増大を図る事業として, 高知県内水面種苗センターで生産される 2 つの病原菌 (フラボバクテリウム・サイクロフィラムとエドワジエラ・イクタルリを含む) フリーの安全性を担保した海産人工種苗「土佐のあゆ」 (長岩ほか, 2017) が毎年積極的に放流されている.

鏡川下流域には 5 か所の取水堰, すなわち河口側からトリム堰, 廓中堰, 鏡川堰, 江の口鴨田堰, 朝倉堰が連続的に設置され, うちトリム堰と朝倉堰は固定堰, 廓中堰, 鏡川堰, 江の口鴨田堰は可動堰となる (Fig. 1). 1975 年以降, 朝倉堰, 江ノ口鴨田堰, 鏡川堰, 廓中堰の 4 基の改修によって瀬の縮小と淵の拡大等で河床形態が大きく変化したため, アユの生息に適した水域が大幅に減少したと指摘されている (岡村ほか, 1992). よって, 堰の存在はアユの健全な生息に悪影響を及ぼすとして問題視され, この改善に向けた取り組みとして, 川の連続性の確保が進められ, 2013 年には朝倉堰の左岸の魚道が大幅に改修された他, 2017 年にはトリム堰の左岸部が改修された. しかし, 依然として両堰直下で遡上障害により稚アユが集積する傾向は今も継続しており, さらなる魚道整備で生息環境改善が求められている (西日本科学技術研究所, 2019, 2020).

アユシーズン中に関係者が最も危惧するのは, 好気性グラム陰性長桿菌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) の流行であり, 釣果に強く影響するために遊漁者数の減少に結びつきやすく, 遊漁料収入にも大きな影響が出る. 鏡川の場合, 稚アユ集積の観点から, 下流域の堰周辺が本菌感染拡大の温床となる可能性は十分に考えられるが, その明確な根拠はまだない. そこで本研究では, 環境 DNA 分析と呼ばれる新たなアユ資源量評価手法 (Yamanaka & Minamoto, 2016) と, 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・定量する既報の手法 (Strepparava *et al.*, 2014) を組み合わせた我々独自の新しいシステムを用いて, これまで感覚的な認識に過ぎなかったアユ冷水病流行を遺伝子レベルから把握することで, 遡上稚アユの生息密度が高くなりやすい傾向にあるトリム堰, 廓中堰, 朝倉堰の周辺において, フラボバクテリウム・サイクロフィラム感染リスク評価を行った.



Fig. 1. 鏡川下流域に設置された 5 基の取水堰. 河口側からトリム堰, 廓中堰, 鏡川堰, 江の口鴨田堰, および朝倉堰. うち, トリム堰と朝倉堰は固定堰, 廓中堰, 鏡川堰, 江の口鴨田堰, および朝倉堰は可動堰となる.

材料と方法

採水作業

採水地点はFig. 2に示す。河口側から本川上流に向かって新月橋直下流にSt.1，トリム堰直上にSt.2，廓中堰直上にSt.3，朝倉堰直上にSt.4の計4地点を設けて，2018年はSt.1からSt.3までの3地点で4月9日から7月20日まで週2～3回の頻度，2019年はSt.1からSt.4までの4地点で3月4日から6月25日まで週4～5回の頻度で河川水1 Lを採水した。採水時には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記録した。



Fig. 2. 採水各地点の位置と採水期間・回数（左），現地での採水作業の様子（右）。

DNA抽出

採水した河川水1 Lを孔径0.2 μ 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。

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 β' 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Strepparava *et al.* (2014)，後者はアユ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。

*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'-CAAATAACATATCCTTTTTCTACAACCTTGA-3'

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

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

PCR反応液は，TaqMan Fast Advancedマスターミックス10 μ L（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製），10 μ M各プライマー溶液0.6 μ L，5 μ Mプローブ溶液0.8 μ L，環境水試料由来DNA溶液1 μ L，滅菌水7 μ Lからなる全量20 μ Lとし

た．PCR反応は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）を用いて、反応条件はマニュアルに従い、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10倍階段希釈したコントロールプラスミドDNAで作成した検量線で算出した．

結果と考察

鏡川の鏡ダム下流域では2006年から毎年、アユ漁解禁日前の人為的減耗がなく、かつ遡上盛期の5月下旬にアユ資源量が推計されている．2018年の推定生息尾数は5月24日～25日時点で46万尾とされ、これは50万尾を超えた2012年に次ぐ多さであり、その一方で、2019年は5月28日～30日時点で過去二番目に少ない16.3万尾とされた（西日本科学技術研究所、2019, 2020）．同日での河川水1 Lあたりのアユ*cyt b*遺伝子を見ると、2018年5月24日のSt.1とSt.2で1.E+05 copies, St.3で2.E+05 copiesとなり、全3地点で10⁵オーダーとほとんど差がなかったのに対し、2019年5月28日～30日のSt.1で1.E+05～1.E+06 copies, St.2で7.E+04～2.E+05 copies, St.3で1.E+05～3.E+05 copies, St.4で4.E+04～3.E+05 copiesと最大値と最小値間で約100倍差があり、これらの遺伝子量は兩年間の推定生息数の3倍近い差と比例関係になかった（Fig. 3）．占部ほか（2020）によると、鏡川における野外調査からアユ遡上量とアユ*cyt b*遺伝子量に有意な相関が認められ、本研究と同手法で遡上の多少を相対的に評価できるとしている．また、その際に遡上評価に用いた同一スコア内でアユ*cyt b*遺伝子量に最大1,000倍差が見られたとし、その理由として、調査地点の上流に定着した遡上アユの影響を挙げ、遡上初期の3月よりも定着アユ数の多くなる盛期と終期の方が高値になりやすいことを指摘している．また、彼らは、水槽実験で12.7尾/m²以上、鏡川の野外調査で5.5尾/m²以上の高生息密度になると、検出されるアユ*cyt b*遺伝子量はプラトーに達するとし、高生息密度に有意な相関がなくなるのは、生息密度が平米で算出されるため、実際は水深や河川流量の影響も考慮する必要があるとしている．本研究の場合、西日本科学技術研究所の潜水目視調査から2018年にトリム堰下と朝倉堰下で5.5尾/m²以上のアユ生息が観察されていたが、採水地点を堰直上の湛水部に設けたため、検出・定量したアユ*cyt b*遺伝子はそうした堰直下の集積アユ由来のものを含まない遡上状況が反映されたと考える．

アユ環境DNAは排出される分泌物や糞に含まれるため、どの区間の生息アユに由来したものかについて、環境の異なる河川毎で大きく変わることは十分想定される．赤松ほか（2017）は山口県佐波川での現地実験によって、アユ環境DNA濃度は採水地点から400～800 m程度上流の区間のアユの現存量であったと示唆している．仮にこの範囲を本研究の採水地点に当てはめると、おおよそSt.1で新月橋～トリム堰区間、St.2でトリム堰～廊中堰区間、St.3で廊中堰～鏡川堰区間、St.4で朝倉堰～宗安寺前区間のアユ生息状況をそれぞれ反映していることになる．また、上記でも述べたように各堰の直上に採水地点を設けているため、堰直下のアユ集積の影響はないとみなされる．こうした考えのもと、St.3の約300 m下流とSt.4の約1.5 km上流はアユ放流が行われる場所であり、St.2とSt.4を主に放流時後アユ*cyt b*遺伝子の増加を伴う可能性がある．2018年に下流域で放流された推定尾数は4月1日に8,000尾、4月22日に6,000尾、5月6日に10,000尾、5月16日に17,000尾であり（西日本科学技術研究所、2019）、St.2でその影響を受けたと思われるアユ*cyt b*遺伝子の増加は特に見られなかった．これは、西日本科学研究所の潜水調査時の5月24日～25日時点でトリム堰～廊中堰区間は12.2万尾という大量の数が推定されていたことから、放流アユの影響の少なさが伺える．またこの年のアユの遡上量の多さは、調査期間の4月9日～7月20日までのアユ*cyt b*遺伝子の推移からも示され、全29回を通して3地点全てで常に検出され、最低値は4月13日のSt.3で7.E+04 copies, 最高値は5月7日のSt.2で1.E+06 copiesとなり、期間中10²オーダー程度の差に留まった．

2019年は遡上初期でのアユ*cyt b*遺伝子の増加傾向の中、10⁶オーダー以上の目立った高値が確認され、St.1で3月8日に2.E+07 copies, St.2で3月14日に3.E+06 copies, 4月1日に6.E+06 copies, 4月3日に2.E+06 copies, St.4で4月10日に4.E+06 copiesとなった．それらのうち、3月8日のSt.1と3月14日のSt.2での遺伝子量は、まだ放流のなかった状況から大量の天然アユ遡上を示した可能性がある．国土交通省の気象庁のデータ（<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>）によると、3月は2日に3 mm, 3日に15.5 mm, 4日に6 mm, 6日に13.5 mm, 10日に21.5 mm, 11日に8 mmの日降水量がそれぞれ記録されており、この程

度の雨では遡上刺激は考えにくい。一方で、4月1日と4月3日のSt.2、4月10日のSt.4について、下流域で放流された推定尾数は3月24日に10,000尾、3月31日に21,300尾、4月29日に8,000尾、5月6日に10,000尾、5月21日に11,700尾であり（西日本科学技術研究所，2020），遡上初期ゆえの天然アユの遡上量と定着尾数の少なさからも、アユ放流によるアユ*cyt b*遺伝子増加への寄与が示唆された。

占部ほか（2020）は、目視調査でアユが観察されなかった場合でも、河川水からアユ環境DNAが検出されたとして、アユの生息有無の判定に活用できるとしている。2019年の調査期間である3月4日～6月25日の全80回の中で、3月4日のSt.2と3月25日のSt.4でアユ*cyt b*遺伝子が検出されず、一時的にアユ不在と思われる状態にあった。5月に入ると、St.1の最低値は21日の4.E+04 copiesと最高値は30日の1.E+06 copies、St.2の最低値は21日の4.E+04 copiesと最高値は10日の9.E+05 copies、St.3の最低値は21日の2.E+04 copiesと最高値は10日の4.E+05 copies、St.4の最低値は22日の9.E+03 copiesと最高値は9日の7.E+05 copiesとなり、 10^3 オーダー程度の差が見られた。一方で、例年遡上終期となる6月には、St.1の最低値は3日の1.E+05 copiesと最高値は25日の1.E+06 copies、St.2の最低値は11日の7.E+04 copiesと最高値は18日の5.E+05 copies、St.3の最低値は7日の1.E+05 copiesと最高値は13日の2.E+05 copies、St.4の最低値は25日の5.E+04 copiesと最高値は18日の3.E+05 copiesとなり、5月と比べて 10^2 オーダー程度の差にまで縮まり、生息数のピークを迎えたためと推察される。

アユ*cyt b*遺伝子とは異なり、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河川水中の推定菌数に換算できる（Strepparava *et al.*, 2014）。感染アユから排菌される菌量は死亡前よりも死亡後の方が多いとされ（大原ほか，2010），本研究で検出された河川水のフラボバクテリウム・サイクロフィラムは、主にそうした感染アユの排菌由来と想定している。2018年は4月9日、2019年は3月4日の調査開始時からともに全地点で菌*rpoC*遺伝子が検出されたため（Fig. 3），遡上初期の段階で既に感染稚アユが存在したと示唆された。2018年での河川水1 Lあたりの菌*rpoC*遺伝子の推移を見ると、相対的に4月の高値が目立ち、St.1で1.E+04～4.E+04 copies、St.2で1.E+04～1.E+05 copies、St.3で6.E+03～7.E+03 copiesとなり、4月11日にSt.2で調査期間中の最高値が示された。その後、減少傾向の中、6月6日と6月13日にSt.3で5.E+03 copiesと他2地点より目立ったものの、6月25日に地点間差はなくなり、6月28日に唯一St.3で1.E+03 copiesと検出され、7月20日に全3地点で検出されなくなった。

2019年は2018年よりも採水頻度が高かったため、菌*rpoC*遺伝子の推移をより詳細に確認することができた。それゆえ、2019年は検出限界以下の陰性の日が多く見られるようになり、3月にSt.1で22日の計1回、St.2で4日、12日、21日、25日、28日の計5回、St.3で20日の計1回、St.4で21日、22日、25日の計3回、4月にSt.1で9日、11日、12日、16日、17日の計5回、St.2で3日、15日、16日、18日、19日、22日、23日、25日の計8回、St.3で22日の計1回、St.4で2日、11日、16日、23日の計4回、5月にSt.1で15日、21日、23日、27日の計4回、St.2で13日、15日、22日の計3回、St.3で6日、13日、15日、16日、18日、21日、27日の計7回、St.4で5日、15日、21日、22日、23日、27日、28日、29日の計8回となり、6月は全ての日で検出された。3月4日～5月24日の間、4月4日のSt.1の1.E+04 copiesを除き、どの地点も 10^2 ～ 10^3 オーダーでの遺伝子量の検出となり、5月28日以降は 10^3 オーダーを主にやや増加傾向にあり、St.1で20日に1.E+04 copies、St.2で18日に1.E+05 copies、St.3で13日に2.E+04 copies、St.4で13日、17日、21日に1.E+04 copiesと 10^4 オーダー以上も見られ、2018年同様、その中のSt.2で調査期間中の最高値が示された。

冷水病の発生水温の中心は16～20℃とされ（熊谷，2016），この水温域は2018年と2019年ともに4月以降認められ、両年で水温差のない条件下にあると思われたが、明らかに異なった菌*rpoC*遺伝子の推移が示された。このことから、アユの保菌率の上昇や排菌量の増加は単純に水温のみでなく、アユの生息数や他要因との複合的影響で高まると考えるのが妥当である。従来、冷水病の防疫措置として、アユ放流は日間最低水温13℃以上の時期に行うことが推奨されている（農林水産省，2011）。しかし、佐藤と坪井（2018）は、日間最低水温8℃以上の時期であっても、冷水病発生リスクのない水域に放流することができれば、従来と変わらない生残率でアユを増殖することが可能であるとし、さらにそうした早期に放流した小型種苗は従来比で成長率が高く、かつ友釣りでの費用対効果は2.7倍以上高かったことから、早期小型放流を経済性の高いアユの増殖手法と報告している。鏡川の場合、3月の放流は早期にあたるが、その影響を受けて河川水の菌

数が顕著に増加したと懸念されるデータは得られず、早期放流が冷水病リスクを高めるとは今のところ考えにくい。しかし、本研究だけではまだ断定が難しいため、今後も引き続き検討する必要がある。

最後に、鏡川下流域4地点のいずれからもフラボバクテリウム・サイクロフィラムが検出されたことを鑑みると、遡上期の稚アユは最下地点のSt.1で既に感染リスクを持ち、一部は保菌したまま中流域へと遡上している状況にあると判断される。その中で重要視すべきことは、それらの感染アユから排菌されるフラボバクテリウム・サイクロフィラムの菌数であり、一時的に特定の場所で高まり、またその最高値は兩年ともにSt.2で示されるという事実を本研究から初めて突き止めて、St.2が感染拡大の温床に最もなりやすい場所と特定することができた。St.2の上流には廓中堰があり、その直下で感染稚アユが集積すれば、集団感染が起こることは容易に想像でき、遡上時期の冷水病リスクをさらに高めることになる。そのため、アユのスムーズな遡上を促すよう全倒状態にする等の廓中堰の流動的な運用が有効な冷水病対策に繋がり、その可能性を試験運用により早急に検証していくべきで、アユ資源を適正に管理・活用する漁協の取り組みや、遊漁者が安心して釣れる環境づくりにも大きく貢献するものである。

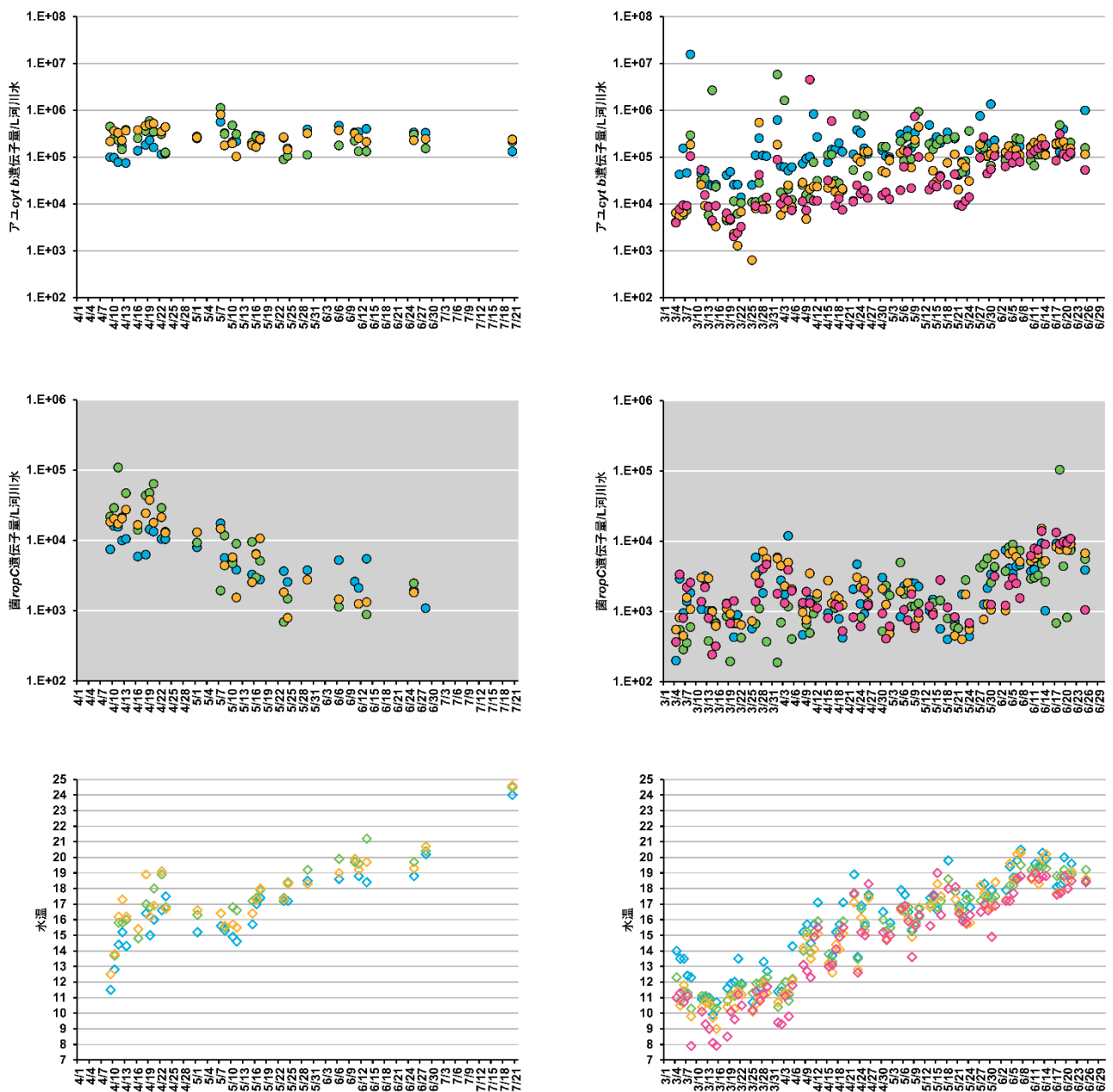


Fig. 3. リアルタイムPCRによるアユ*cyt b*遺伝子(上)と菌*rpoC*遺伝子(中央)、水温(下)の推移。
左に2018年3地点、右に2019年4地点の結果を示した。各シンボルの色はFig. 2の地図上で示したものと同様。

参考文献

- 占部敦史（2020）鏡川における鏡ダム上流域の陸封アユと放流アユの資源寄与管理について．鏡川漁業協同組合第 70 事業年度通常総代会講演会資料．
- 岡村収・為家節弥・青木博幸（1976）鏡川の生物と環境に関する総合調査 鏡川水系の魚類．高知県，pp.81-122．
- 西日本科学技術研究所（2020）アユ遡上状況調査・アユ産卵場調査．平成 31 年度鏡川清流保全環境調査委託業務報告書，pp.1-25．
- 長岩理央・占部敦史・岡部正也（2017）人工種苗「土佐のあゆ」による資源添加技術の確立．平成27年度高知県内水面漁業センター事業報告書，26，13-15．
- 岡村収・確井利明・宮原一・山下慎吾・和田浩史郎（1992）鏡川水系の生物と環境に関する総合調査II 鏡川水系の魚類および甲殻類．高知県，pp.99-146．
- 西日本科学技術研究所（2019）アユ遡上状況調査・アユ産卵場調査．平成 30 年度鏡川清流保全環境調査委託業務報告書，pp.1-26．
- 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.
- 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.
- 占部敦史・隅川和・長岩理央（2020）高知県の天然アユ資源を回復させるための取組支援．平成29年度高知県内水面漁業センター事業報告書，28，9-16．
- 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.
- 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．
- 熊谷明（2016）細菌性冷水病．魚病研究，51，153-157．
- 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．
- 佐藤正人・坪井潤一（2018）アユ友釣り漁場管理における早期小型放流の有用性．水産増殖，66，227-233．

令和 2 年（2020）10月14日受理

令和 2 年（2020）12月31日発行