

環境 DNA を用いた河川魚類の定量モニタリングの現状

山口大学大学院創成科学研究科 准教授 赤松 良久

要 旨

本報告では環境 DNA を用いた河川内の魚類の定量モニタリングに関する最新の研究について紹介した。カワムツを対象とした水路実験やアユを対象とした実河川での検証によって、魚類の生物量と環境 DNA 濃度に有為な相関があることを明らかにした。また、アユの降下動態や産卵場を環境 DNA 濃度の変化から把握することができることも確認した。これらの成果によって、環境 DNA は河川内の魚類の現存量や動態を把握するのに極めて有効な手段であることを示した。

1. はじめに

近年、水を採取して、その中の DNA 情報を調べることで、水域の生物の在/不在やバイオマスを明らかにする環境 DNA 分析の開発が急速に進んでいる。環境 DNA 分析では湖沼や河川において魚類の生息の有無を高い精度で判別可能であり、水 1L から特定の種の在/不在だけでなく、そこにいるすべての魚類相を把握することも可能となりつつある²⁾。しかし、採水した水がどの程度の範囲の水塊を代表するものであるかも不明確であり、とくにバイオマスの推定に関してはその実用性について実証的な検討が必要とされている。そこで、環境 DNA を用いて河川内のアユの現存量や動態を推定する方法を中心に、環境 DNA を用いた河川生物モニタリング手法に関する研究の現状と今後の展開に関して紹介する。

2. 魚類の生物量と環境 DNA 濃度の関係

実験水路および実河川において、環境 DNA 濃度を用いた流水中の魚類量推定の可能性について検証を行った結果を紹介する。

2.1 水路実験における検証

水路実験では河川性遊泳魚の中で、採集および飼育が容易であるカワムツを対象とした。最新の河川水辺の国勢調査の結果、カワムツは西日本の全ての一級河川において生息していることが明らかとなっており、西日本において代表的な純淡水遊泳魚であると言える。

実験水路の概略図を図 1 に示す。実験水路は上流端水槽、水路部、下流端水槽で構成されている。上流端水槽と水路部は連結されており、水路部は長さ 600cm、幅 15cm、高さ 20cm のアクリル製の直線水路となっている。また、実験魚が上流端水槽、下流

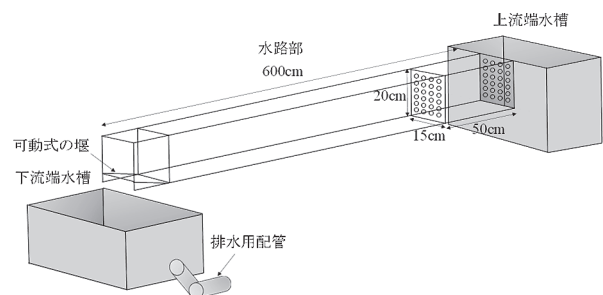


図 1 実験装置³⁾

端水槽へ入り込まないように、水路部の上流端から 50cm 地点にアクリル製の多孔質の仕切り板を設置し、実験中のカワムツの遊泳区間とした。実際にカワムツが遊泳している様子を写真 1 に示す。なお、本実験で使用した水はカワムツの DNA を含む分泌物や排泄物を含んでいるため、再利用が不可能である。そのため、下流端水槽に排水用の配管を取り付け、実験で使用した水は常時排水を行えるようにした。

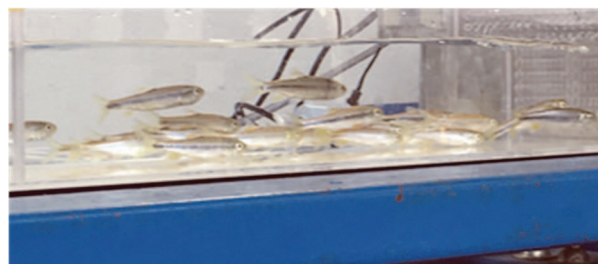


写真 1 遊泳するカワムツの様子³⁾

実験は下流の仕切り板から 15cm 下流の位置で流速が約 0.2(m/s)となる流れの条件で行った。この条件で、カワムツを流水中に投入してから 15 分後以降は、流水に流されたり逆らったりする遊泳行動はとらなくなり、写真 1 のようなほぼ静止した遊泳行動をとることが確認された。したがって、カワムツが十分に水路に馴致した流水開始から 30 分後に、下流の仕切り板から 15cm 下流の位置で、採水を行った。採水したサンプルに対する環境 DNA 分析の大まかな流れを図 2 に示す。採取した 1L のサンプル水を粒子保持径 0.7 μ m(GF/F)のガラスフィルターでろ過することによって、DNA を濃縮する。次に、ろ紙表面に吸着されろ過残留物を用いて DNA を精製し、リアルタイム PCR による計測を行うという流れとなる。環境 DNA の分析法についての詳細は高原ら¹⁾を参考にされたい。

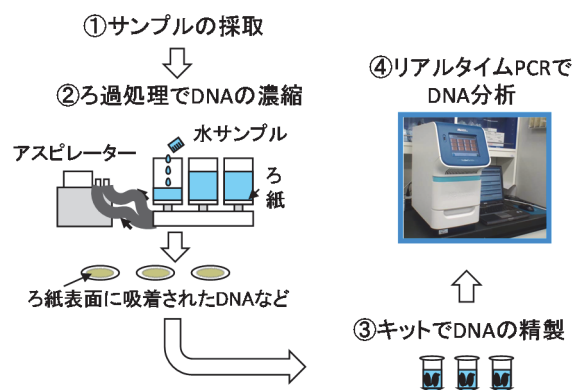


図 2 環境 DNA 分析の手順

実験はカワムツの尾数を 10, 16, 24 と変化させて 3 ケース行った。環境 DNA 分析から得られたサンプルの環境 DNA 濃度と各ケースで用いたカワムツの総重量の関係を図 3 に示す。これらの結果から、環境 DNA 濃度とカワムツの総重量には高い正の相関があることがわかる。この結果は流水中でも環境 DNA 濃度が魚類のバイオマスや密度を高精度に反映する指標であることを示唆している。

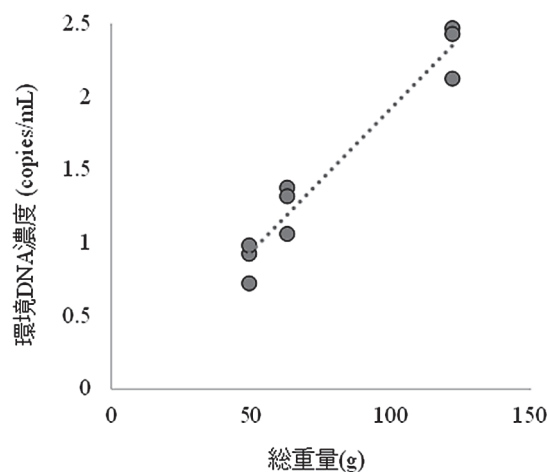


図 3 環境 DNA 濃度と総重量の関係³⁾

2.2 実河川における検証

山口県の瀬戸内海に流入する佐波川において、環境 DNA 量で個体数や生物量が説明できるのかを検証するためにおこなった研究を紹介する。調査は、2015 年 5 月 28 日、7 月 30 日、10 月 7 日の 3 回おこなった。

調査範囲内に瀬が存在する 7 地点を調査地に設定し、まず瀬の下流において表層水 1L を採水した後に、6 地点については、潜水目視によってアユの密度(個体数 m^2)と捕食痕(ハミアト)を、最上流の 1 地点についてはアユの捕食痕のみを調査した。さらに、前年度に佐波川で採集調査をおこなった際に得られていたアユの個体数あたりの重量データ($g \text{ 尾}^{-1}$)を掛け合わせることに

り、アユの生物量 (g m^{-2}) を算出した。

採水した水サンプルは冷暗状態で保管し持ち帰り、当日中に濾過作業をおこない、フィルターは冷凍保存した。冷凍保存したサンプルから DNA を抽出後、Yamanaka and Minamoto⁴⁾により発表されていたアユに特異的なプライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR 法で DNA を定量化した。野外調査や分析手法の詳細については Doi et al.⁵⁾を参照していただきたい。

各月のアユの環境 DNA 濃度を図 4 に示している。各月ともに、目視でアユの個体が確認できた下流(地点 1~3)のほうが環境 DNA の濃度が高く、目視ではほとんどアユの個体自体は確認されなかったが、捕食痕が確認されたような地点(4~7)では、低濃度であるが環境 DNA が検出されており、捕食痕が確認されなかった地点(7)では環境 DNA が検出されないという結果となった。また、10 月の下流域の産卵場付近は、とくに環境 DNA 濃度が高いことが明らかになった。さらに、5 月、7 月、10 月それぞれのデータを用いて、アユの密度(個体数 m^{-2})と生物量 (g m^{-2})の関係性をみたところ、密度、生物量ともに、すべての月で強い正の関係性を示していた(図 5)。

これらの結果から、アユを対象とした場合は、環境 DNA 分析は、潜水目視調査よりも高精度にアユの生息(在/不在)を判別できるだけでなく、密度や生物量の推定も十分に可能な手法であるということが示された。また、産卵期の産卵場付近で濃度が高くなる可能性が高いことから、アユの産卵にともなう降下や、産卵のモニタリングにも応用可能であることが示唆された。これについては、4 章に述べている。

3. 高津川と佐波川におけるアユの降下モニタリングについて

前章で対象にした佐波川と、島根県の日本海に流入する高津川において、2016 年の 10 月から 11 月にかけて約 2 週間に 1 回の計 4 回、佐波川では河口から約 9km 区間内の 6 つの瀬の上下流の 12 地点、高津川では河口から約 11km の区間内の 6 つの瀬の上下流(ただし、最上流のみ 1 地点)の 11 地点を対象に表層水 1L

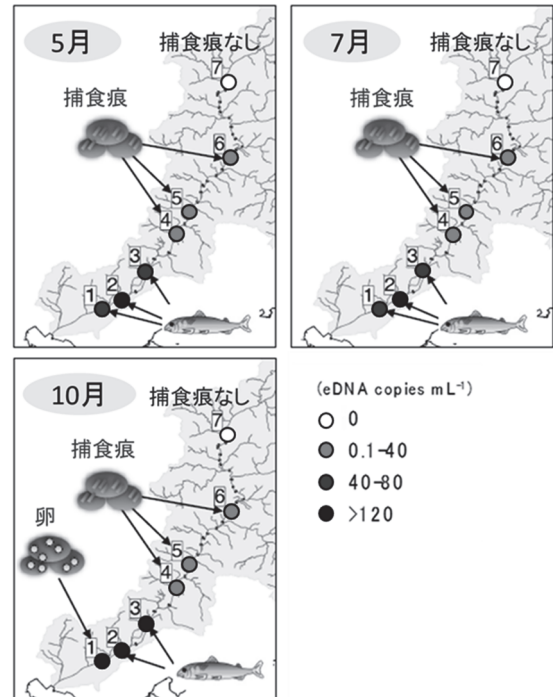


図 4 佐波川におけるアユの環境 DNA 濃度の空間分布⁵⁾

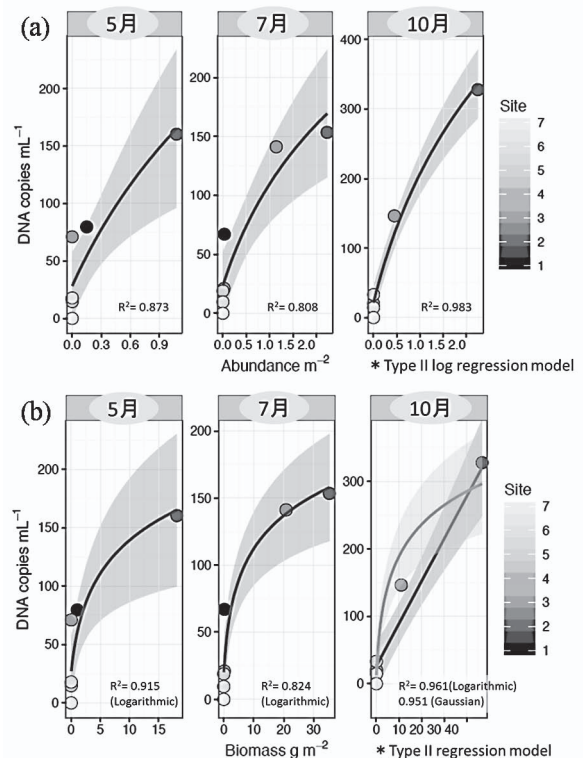


図 5 アユの環境 DNA 濃度と (a) 密度(個体数 m^{-2}) および (b) 生物量 (g m^{-2}) の関係性⁵⁾

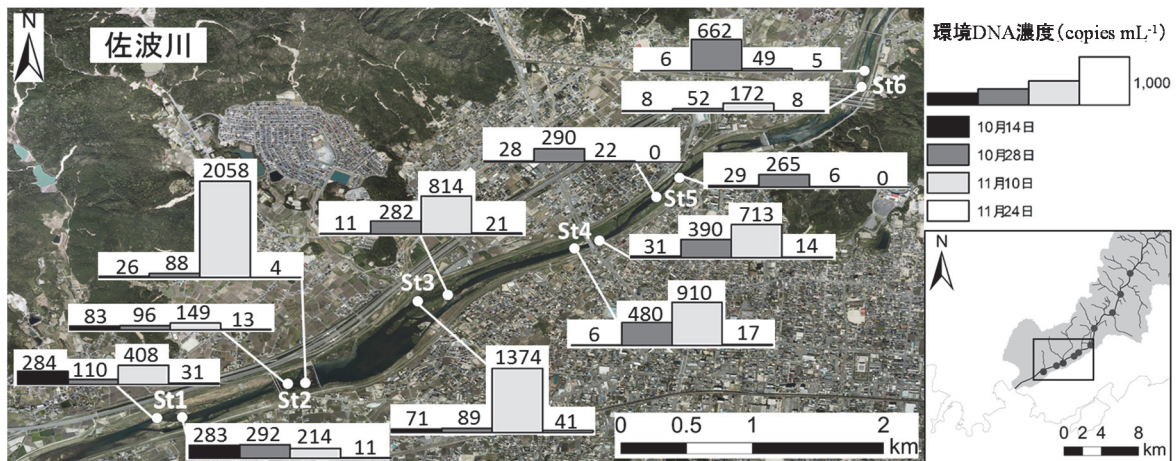


図6 佐波川下流域における2016年10月および11月の環境DNA濃度⁶⁾

の採水をおこない、アユに特異的なプライマー・プローブ³⁾を用いて定量PCRをおこなうことにより、秋季の降下・産卵期におけるアユの動態を把握することを試みた。方法および結果の詳細については河野ら⁶⁾を参照していただきたい。

図6に佐波川における環境DNA濃度を示している。環境DNAの全地点の平均濃度をみると、10月上旬から11月下旬にかけて濃度が増加し、11月上旬にピークとなり(574.2 copies mL⁻¹)、11月下旬には大幅に濃度が減少することが明らかになった。また、11月上旬には、河口から4.2kmから6.3kmの区間(St.2~St.4)で高い濃度が検出され、河口から4.2km付近(St.2)でピークとなることが明らかになった。図7に高津川における環境DNA濃度を示している。環境DNAの全地点の平均濃度をみると、佐波川同様に10月上旬から11月下旬にかけて濃度が増加し、11月上旬にピークとなり(43.8 copies mL⁻¹)、11月下旬には大幅に濃度が減少することが明らかになった。また、11月上旬には、河口から1.7kmから4.6kmの区間(St.2~St.4)で高い濃度が検出され、河口から1.9km付近(St.2)でピークとなることが明らかになった。

これらの結果から、両河川ともに、11月上旬をピークに下流域に降下し、この時期が産卵の最盛期である可能性が高いことが明らかになった。また、両河川ともに、下流域の中でもとくに高濃度のDNAが検出される地点がみられたことから、これらの地点周辺が、アユの主要

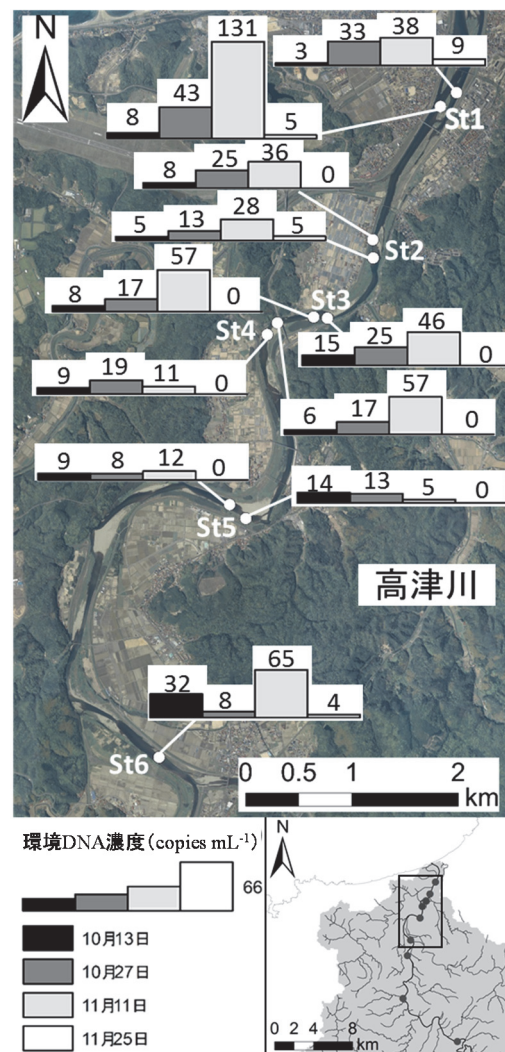


図7 高津下流域における2016年10月および11月の環境DNA濃度⁶⁾

産卵場である可能性が高いと予想された。佐波川と高津川においては、2017年以降も引き続き、アユの産卵時間に該当する夜間における採水等の詳細な調査をおこなっている。

4. アユの産卵場モニタリング

奈半利川は、電源開発が積極的に行われた河川であり、中上流に昭和30年代に3つのダムが建設され、河川水は発電のために高度に利用されている。ダムの貯水池や減水区が流程60kmの大部分を占め、川本来の水量を保っているのは源流部のみとなっている。また、ダムによる濁水の長期化がしばしば発生し、これまで大きな漁業被害を出してきた。そのため、天然アユ資源を保全するための取り組みとして、2003年から人工産卵場の造成を開始し、並行して夏から秋にかけていくつかの漁獲規制を設けた結果、2005年以降、それ以前の2カ年と比較して、仔魚の流下量は数十倍レベルで増加し、遡上量も2009年以降増加・安定傾向に転じた。また、人工産卵場におけるアユの産卵状況の調査の結果、人工産卵場が奈半利川における主要産卵場となっていることが明らかとなっていた。本章では、アユの卵の分布についての長期モニタリングデータが蓄積されている奈半利川の利点を活用し、アユの産卵状況モニタリングとしての環境DNA分析手法の有効性の検証を試みた研究を紹介する。詳細については乾ら⁷⁾を参照していただきたい。

2005年から2016年の人工産卵場と自然産卵場の卵密度を比較すると、卵密度は一貫して人工産卵場で圧倒的に高かったため、人工産卵場の下流で採水したサンプルのDNA濃度が、他地点で採水したサンプルよりも高くなるであろうという想定のもとにおこなったものである。野外調査は、2017年10月から12月にかけて4回おこなった。産卵期前後は日中(およそ14時から16時の間)のみ、産卵期にあたる11月9日と11月24から25日にかけての2回については、日中と日没約3時間後(以下夜間)に採水をおこなった。アユの産卵は日没前後から活発化することが知られているため、産卵期に

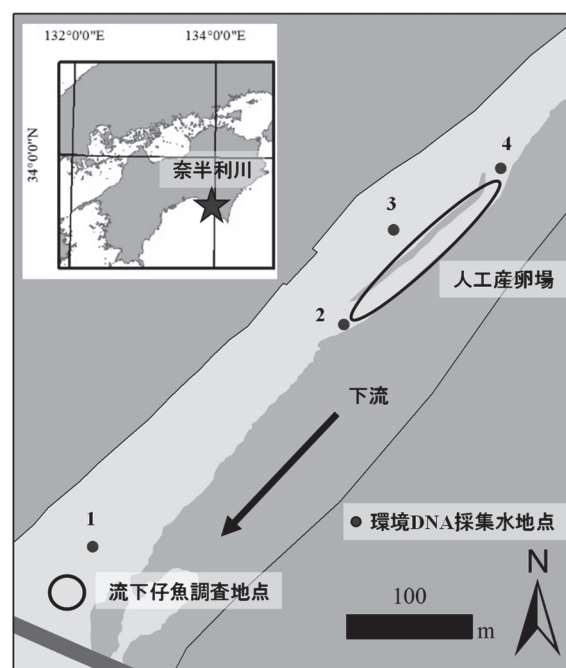


図8 奈半利川の人工産卵場周辺での調査地点⁷⁾

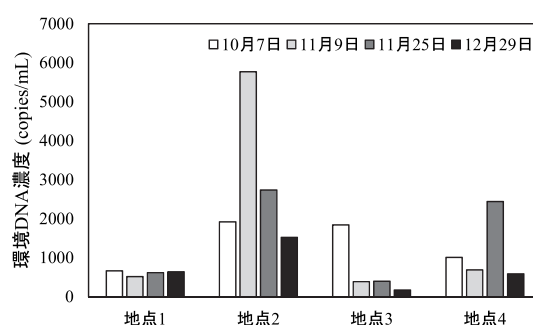


図9 昼間採水サンプルから得られた環境DNA濃度の時系列変化⁷⁾

における産卵場において夜間に得られたサンプルの環境DNA濃度が、日中に比べて高くなることが予想されたためである。調査地点は、人工産卵場の直下と、近傍の本流、下流、上流の対の4箇所を設定し(図8)、これらの地点において、表層水1Lを採集し、冷却して持ち帰り、濾過後フィルターからDNAを抽出し、アユに特異的なプライマー・プローブ²⁾を用いて、リアルタイムPCR法でDNAを定量化した。

日中のサンプルを用いた環境DNA濃度の時系列比較についての結果を図9に示している。各調査日における日中の分析結果を示している。各調査回での環境DNAの平均濃度は、10月7日は 1357 ± 622 copies mL⁻¹,

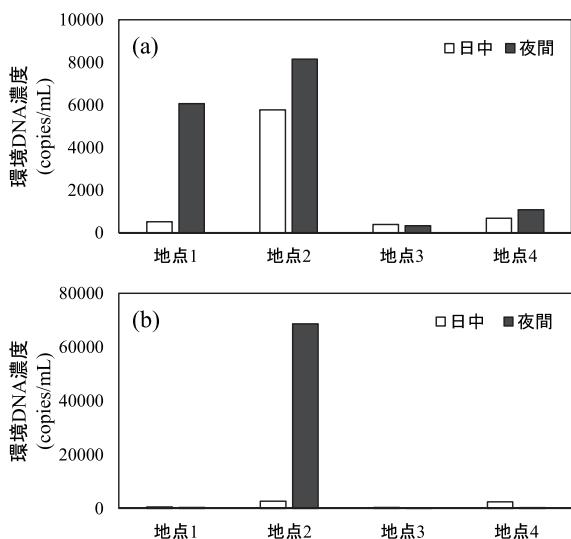


図 10 環境 DNA 濃度の昼夜間比較. (a)11 月 9 日, (b)11 月 24 から 25 日⁷⁾

11 月 9 日は 1837 ± 2622 copies mL^{-1} , 11 月 25 日は 1546 ± 1210 copies mL^{-1} , 12 月 29 日は 730 ± 569 copies mL^{-1} となり(平均 \pm 標準偏差), 産卵盛期となる 11 月中盤にかけて増加し, その後減少に転じることが明らかになった. また, 全ての調査を通して人工産卵場の直下である地点 2 の濃度が最も高かった. これらの結果から, 日中のデータを比較することで, アユの産卵期や産卵場への蝟集が明らかになることが示された.

日中と夜間の環境 DNA 濃度の比較についての結果を図 10 に示す. 11 月 9 日は 3904 ± 3805 copies mL^{-1} (平均 \pm 標準偏差)となり, 平均値で比較すると日中の約 2 倍になっていた. 11 月 25 日は 17349 ± 34169 copies mL^{-1} (平均 \pm 標準偏差)となり, 平均値で比較すると日中の約 11 倍になっていた. これらの結果から, 産卵期においては, 日中よりも夜間のほうが検出される DNA 濃度が高くなることが示された. 人工産卵場造成日である 11 月 9 日に着目してみると, 人工産卵場の直下である地点 2 の濃度は日中, 夜間ともに全地点で最も高いものの, 日中に比べて夜間の濃度は 1.4 倍程度であり, 顕著に増加した訳ではなかった. この理由として, 奈半利川におけるアユは, 人工産卵場の造成直後直ちに人工産卵場に蝟集することがこれまでの調査で知られており, 2017 年においても実際に人工産卵場に蝟集していたことも観察されていることから, 日中の DNA 濃度も高くなった

ことが予想される. 産卵盛期である 11 月 24 から 25 日に着目してみると, 人工産卵場の直下である地点 2 の濃度は, 11 月 9 日同様日中, 夜間ともに全地点で最も高いだけでなく, 夜間の濃度が日中の約 25 倍 (68602 copies mL^{-1}) に増加した. これらの結果から, アユが夜間に産卵場に蝟集し産卵し, 環境 DNA 分析がそのアユの生態を捉えられている可能性が高いことが示された. これらの結果から, アユの降下・産卵期における環境 DNA 分析は, 日中の分析結果を時系列で比較することによりアユの産卵期や産卵場への蝟集を, 日中と夜間の結果を比較することにより, アユの好適産卵場を示すことができる有用なツールであることが明らかになった.

5. 多摩川における広域調査

全国的な傾向としてアユの資源量は減少している一方, 山梨県に発し東京湾に流入する多摩川では, 1990 年代以降から増加していることが知られている. 著者は, 全国的にアユの資源量を回復させるためには, 多摩川でアユが増加した要因を解明することが重要と考え, 基礎的知見の収集の一環として, 環境 DNA を用いたアユのモニタリングをおこなっている. 今回は, 2017 年 9 月 6 ~ 8 日におこなった広域調査の結果について紹介したい. この調査では, 多摩川水系内の広域におけるアユの分布および生物量の把握を目的として, 本川では河口から奥多摩湖の上流までに 40 点, 9 つの支川に 29 点の計 69 点を設定した. 採水地点は, 瀬の下流を基本とし, 調査では, 基本的に瀬の下流の表層水 1L を採水し, 持ち帰り濾過, 濾紙から DNA を抽出した後に, アユに特異的なプライマー・プローブ⁵⁾を用いて定量 PCR をおこなった. 方法の詳細は内藤ら⁸⁾を参照していただきたい.

図 11 に各地点の環境 DNA の濃度を示している. 全体的な傾向としては, 奥多摩湖より上流は検出されない地点が多かった一方, 奥多摩湖より下流では多くの地点で検出され, また下流方向に行くに従い濃度が増加する傾向がみられ, とくに多摩川本川の約 22~37km の範囲には高濃度の環境 DNA が検出される地点が集中していた. 多摩川で検出された環境 DNA 濃度と佐波川

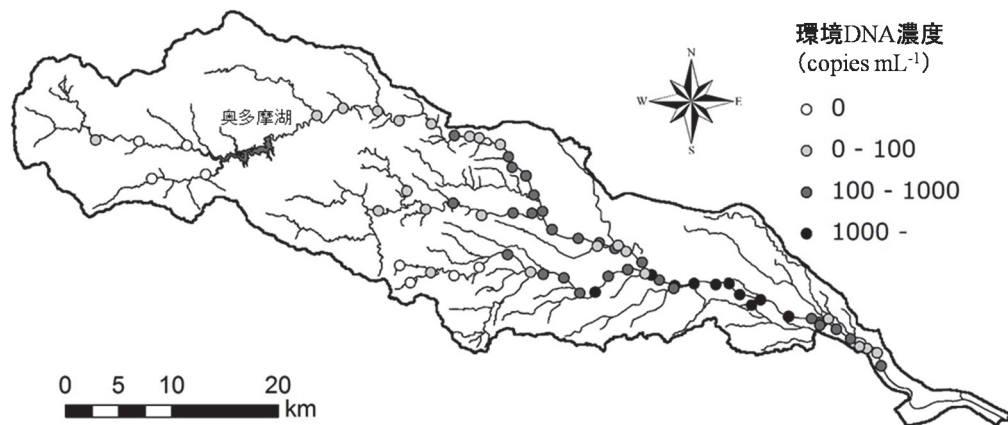


図 11 多摩川流域におけるアユの環境 DNA 濃度の分布

および高津川の環境 DNA 濃度⁶⁾と比較してみると、多摩川本川 40 地点の環境 DNA 濃度の平均値は 1409.3 copies mL⁻¹、ピーク値は 15681.8 copies mL⁻¹であったことに対し、佐波川の 7 月における環境 DNA 濃度の平均値は 70.9 copies mL⁻¹、ピーク値は 333 copies mL⁻¹、高津川の 7 月における環境 DNA 濃度の平均値は 32.7 copies mL⁻¹、ピーク値は 75 copies mL⁻¹であった。多摩川で検出された値は、中国地方で比較的にアユが高密度で生息している佐波川と比較した場合においても、平均値で約 20 倍、ピーク値で約 47 倍となり、多摩川では極めて高濃度のアユの環境 DNA が検出されたことがわかる。実際、現地でもアユの友釣りをしていて釣り人にヒアリングをおこなった際も、高濃度で検出されていた地点では好釣果である場合が多かったことから、全国的にみても多くのアユが生息していることは紛れもない事実であろう。今後は、多摩川においてどのような理由でアユが増加したのかの原因を探っていきたいと考えている。

6. おわりに

ここで紹介したように、環境 DNA は河川内の魚類の現存量や動態を把握するのに極めて有効な手段である。特に、川幅が広い河川における採捕調査では、魚類の現存量を把握するのは困難であり、今後は環境 DNA による現存量調査の導入が期待される。しかし、河川内で採水された水サンプル中の環境 DNA 濃度がどの程度

の範囲の現存量を反映するかといったことや、水温や阻害物質の影響については未だ十分な検討がなされていない。したがって、現段階では、環境 DNA 濃度は現存量の絶対指標として用いることは難しく、環境条件が大きく変わらない地点間での相対指標として用いるのが適当である。

著者は魚類の環境 DNA 濃度の影響範囲や、環境 DNA の起源である魚類の糞や粘液の河川内での動態に関する検討を進めている。今後、これらの研究成果によって、環境 DNA を用いた生物量の絶対値の推定を目指している。

参考文献

- 1) 高原輝彦, 山中裕樹, 源利文, 土居秀幸, 内井喜美子: 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, 2016.
- 2) 赤松良久, 都築隆禎, 横山良太, 舟橋弥生, 太田宗宏, 畔上雅樹, 内藤太輔, 乾隆帝: 河川水辺の国勢調査による魚類相調査と環境 DNA メタバーコーディング解析の比較検討, 土木学会論文集 B1(水工学), Vol.74, No.5, I_415-I_420, 2018.
- 3) 乾隆帝, 赤松良久, 高原輝彦, 後藤益滋, 一松晃弘: 流水中におけるカワムツの生物量と環境 DNA 量の関係性—水路実験と野外への適用—, 河川技術論文集, 第 23 巻, pp.651-656, 2017.

- 4) Yamanaka, H., Minamoto T. , 2016. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators* 62, 147–153.
- 5) Doi, H.*, Inui*, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T., Minamoto, T., 2017. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology* 62, 30-39. *The both authors equally contributed.
- 6) 河野誉仁, 赤松良久, 後藤益滋, 乾隆帝: 環境 DNA を用いたアユの定量化と降下状況モニタリングの試み, *河川技術論文集* 23, 669-674, 2017.
- 7) 乾 隆帝, 高橋勇夫, 後藤益滋, 赤松良久, 河口洋一: 高知県奈半利川におけるアユ人工産卵場の利用状況モニタリング～潜水目視調査と環境 DNA 分析の比較を中心に～, *河川技術論文集*, 第 24 巻, pp. 333-338, 2018.
- 8) 内藤太輔, 赤松良久, 乾 隆帝, 後藤益滋, 小室隆, 今村 史子: 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*, Vol. 1.74, No.4, I_517-I_522, 2018.