

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—

RELATIONSHIP BETWEEN THE CONCENTRATION OF ENVIRONMENTAL DNA AND THE BIOMASS OF DARK CHUB *Candidia temminckii* UNDER THE RUNNING WATER - CHANNEL EXPERIMENT AND APPLICATION TO FIELD-

乾 隆帝¹・赤松 良久²・高原 輝彦³・後藤 益滋⁴・一松 晃弘⁵
Ryutei INUI, Yoshihisa AKAMATSU, Teruhiko TAKAHARA, Masuji GOTO and
Akihiro HITOTSUMATSU

¹正会員 博（農） 山口大学大学院特命助教 創成科学研究科
（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

²正会員 博（工） 山口大学大学院准教授 創成科学研究科（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

³非会員 博（学術） 島根大学助教 生物資源科学部（〒690-8504 島根県松江市西川津町1060）

⁴正会員 博（工） 山口大学大学院学術研究員 創成科学研究科
（〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1）

⁵学生会員 修（工） 中電技術コンサルタント株式会社（〒734-8510 広島市南区出汐2-3-30）

Environmental DNA (eDNA) analysis is considered a powerful tool for estimating the biomass as well as the presence / absence of aquatic organisms in rivers. However, few studies have clarified the relationship between biomass and environmental DNA concentration in running water experiments. In this study, we revealed the relationship between eDNA concentration and biomass of Dark chub *Candidia temminckii* in a running water experiment. Furthermore, we attempted to quantify the eDNA concentration of *C. temminckii* at three rivers in Chugoku district, Japan. The results of the running water experiment revealed a clear positive relationship between the eDNA concentration and the total weight of *C. temminckii*. In addition, the eDNA of *C. temminckii* was detected in samples from all sites.

Key Words : ecosystem management, environmental DNA, fish, freshwater, resource ,river

1. はじめに

近年、河川における生態系管理は、希少生物の保全だけでなく、普通種も含めた生態系の調査や把握が必要不可欠となっている。現在、河川における生態系管理においては、主に種多様性に着目した調査データは集積されつつある一方、生物の量に関する情報の蓄積は少ない¹⁾。その理由として、河川における生物量の把握は陸域と比べて困難であり、特に魚類に関しては網などを用いても正確な現存量を把握できていないという課題があるためである。これに対して、近年、湖沼や河川で採取した1L

程度の水サンプルに浮遊・存在するDNA（環境DNA）の情報を調べることで、水棲生物の生息状況を評価する生物モニタリング手法の開発が急速に進んでいる^{2), 3), 4), 5)}。この手法は環境DNA分析と呼ばれており、近年は、河川における生物の在・不在⁶⁾だけではなく、環境DNAの量が生物量と強い正の関係性があることも明らかになってきており、生物量を推定できる技術としての可能性も示されている⁷⁾。それゆえ、環境DNA分析は、今後の河川における生態系管理において、重要なツールの一つになると考えられる。

現在、環境DNA量と生物量の関係についての実験的研究としては、止水環境において環境DNA量と生物量

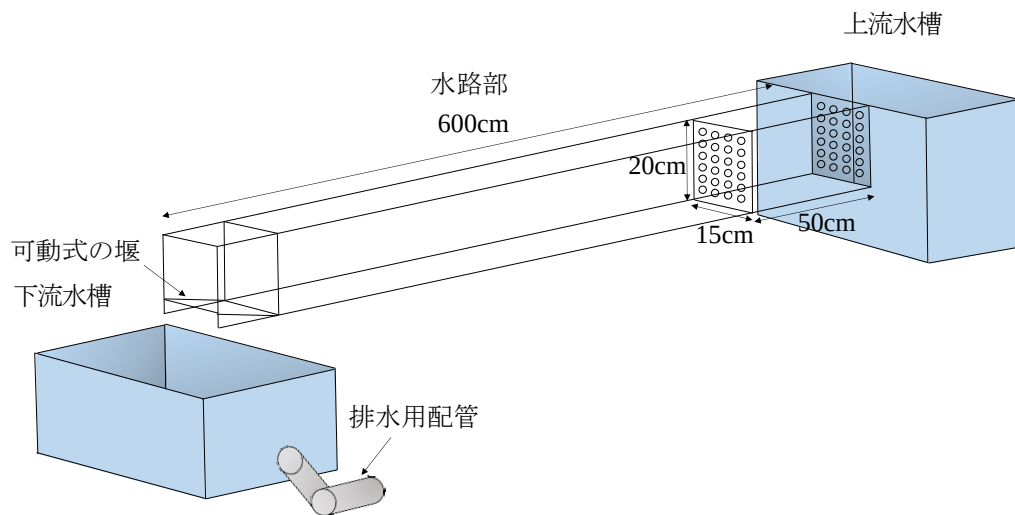


図-1 実験装置

の関係性を明らかにしたものが中心であり^{8), 9), 10)}, 流水環境における研究例は少ない。止水環境では、生物から排出された環境DNAは水中に滞留していると考えられる。一方、流水環境では、水が生物と接する時間が少なく、さらに環境DNAを含んだ水は流下していくため、止水環境とは異なり、流下環境DNA濃度が生物量を正確に反映しない可能性も想定される。よって、流水環境である河川において環境DNA分析を適用するうえで、流水環境中においても、環境DNA濃度が生物量を反映するかを検証することが必須である。これまでの流水環境中の環境DNA量と生物量との関係については、野外における目視調査による個体数・生物量と環境DNA濃度の関係性を示したものが中心であるため⁷⁾, 正確な生物量が判明している流水環境下で、生物量と環境DNA量の関係性を明らかにした研究例は少ない。よって本研究では、河川に生息する純淡水魚であるカワムツ *Candidia temminckii*¹¹⁾ を用い、流水水路における実験により、流水環境下における生物量と環境DNA量の関係性を明らかにし、さらに、野外への適用を目的として、中国地方の3水系から得た水サンプルの環境DNA分析を行うことにより、各河川・各地点におけるカワムツの生物量の定量化を試みた。

2. 方法

(1) 対象魚種

本研究で実験対象魚として選定したカワムツは、西日本各地の河川と湖沼に分布するコイ科の純淡水性魚類である。河川においては中・上流域の流れの緩やかな淵を中心に生息し、岩などが点在する場所や、岸辺の植物が水面に覆いかぶさったような環境を好む¹²⁾。本種は西日

本全ての一級河川において生息している¹³⁾普通種であること、また、河川に生息する遊泳性魚類のうち、採集および飼育の点で容易であるため、流水水路での実験対象魚として優れている。

(2) 水路実験

実験装置は、貯水槽、上流水槽、水路部、下流水槽により構成され、実験水は貯水槽→上流水槽→水路→下流水槽の順に流れる仕組みとした（図-1）。水路は長さ600cm、高さ20cm、水路幅15cm、水路勾配1/1000の亚克力製の直線水路で、水路上端と50cm地点には亚克力製の流水板を取り付け、実験魚の遊泳区間とした。本実験装置は、上流水槽から水路部への流入量が調節可能であり、また、水路下流端の可動式の堰により、水深や流速の調節が可能である（図-1）。なお、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可能な仕組みにした（図-1）。

今回行った実験は、上流端から3.5m地点での流速を0.2m/s、水深を6.5cmに固定し、可能な限り近いサイズ、重量のカワムツを用いて、個体数を10, 16, 24尾で行った。実験手順としては、まず事前準備として、実験開始の24時間以上前に水路の貯水槽に水道水を貯め、次に、実験開始の約12時間前に、遊泳区間の仕切り内に水深約10cm程度に水を入れたナイロン袋を設置し、その中に供試魚のカワムツを投入し、エアレーションをおこない、水路環境での事前馴致をおこなった。まず実験水路内に水を流し、水位が安定した後、上流方向に逆流しないように注意し、ナイロン袋内に馴致しているカワムツを仕切り内に放流した。その後、水路内の遊泳区間と、3.5m地点において、水深についてはポイントゲージを用い、流速については電磁流速計（エヌケーエス製、PVM-3）を用いて測定した。流量は50Lのコンテナを用い、ス

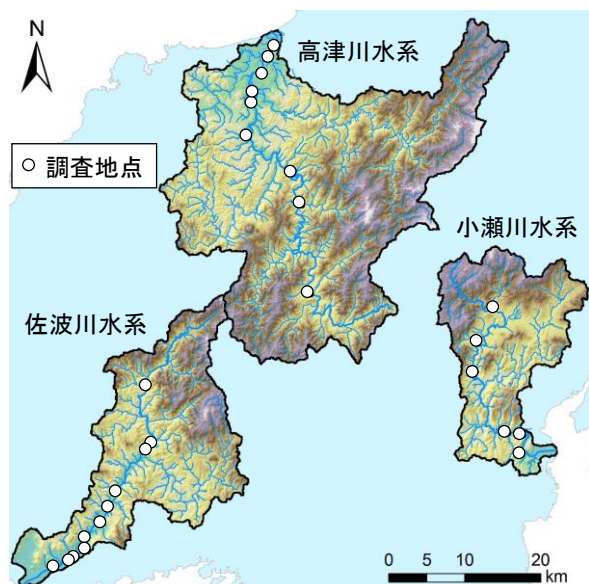


図-2 小瀬川、佐波川および高津川の調査地点図

トップウォッチで容量が満たされるまでの時間を計測することにより測定をおこなった。採水(1L)は、水位が安定してから20分後に開始し、上流端水槽（コントロール）および水路の上流端から1.5mの地点において、5分間隔で3回、ボトルを用いておこなった。なお、採水に用いたボトルは、使用前に次亜塩素酸ナトリウム漂白剤（市販製品の10%濃度）で漂白し、DNAを含まない脱イオン水によって洗浄して使用した。また、各実験に用いたカワムツは、実験終了後、全個体の全長(mm)、体長(mm)、体重(g)を測定した。なお、上流端水槽については、実験中常時エアレーションをおこなった。

(3) 中国地方河川における分布特性

野外での適用を目的として、中国地方の1級水系である小瀬川、佐波川および高津川において、2016年の夏季に採水をおこなった。小瀬川については2016年7月19日に本川の河口から5kmから42.5kmの間に6地点、佐波川については2016年7月21日に本川の河口から4.2kmから36.5kmの間に11地点、高津川については2016年7月27日に本川の河口から2.1kmから58.6kmの間の9地点の計26地点でおこなった。各河川の調査地点については図-2に示している。各地点ともに、瀬の下流側において表層水1Lを採集した。採水に用いたボトルは、上述の実験同様に、使用前に次亜塩素酸ナトリウム漂白剤で漂白し、DNAを含まない脱イオン水によって洗浄して使用した。また、輸送時のDNA混入による汚染の有無を確認するため、輸送時のクーラーボックスの中に、水サンプルを採集したボトルと同様のものに脱イオン水を入れて、ネガティブコントロール（以下、クーラーブランク）とした。すべてのサンプルは冷却して持ち帰った。

(4) 環境DNA分析手法

カワムツに種特異的なプライマーおよび蛍光プローブは、ミトコンドリアDNAのCytochrome *b*領域の塩基配列から設計を行った（Takahara et al. 未発表）。このプライマー・プローブを用いたところ、近縁種のヌマムツ *Candidia sieboldii*¹¹⁾、ハス *Opsariichthys uncirostris uncirostris*¹¹⁾およびオイカワ *Opsariichthys platypus*¹¹⁾の筋肉から抽出したDNAではPCRで増幅せず、カワムツの筋肉から抽出したDNAのみ増幅することを確認した。

水路実験、野外調査ともに、GF/F ガラスフィルター (pore size c. 0.7 μ m; GE Healthcare, Little Chalfont) で濾過した。また、濾過時のDNAの混入を確認するため、同様の手法で脱イオン水を濾過することにより、ネガティブコントロールとして用いた。フィルターからの抽出は、サリベットチューブ (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) およびDNA抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) を用いてDNA溶液を抽出した¹⁴⁾。抽出したDNAのサンプルは、PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham) を用いて定量PCRをおこなった。定量化のための検量線は、各PCRごとにプラスミドによってクローニングされたカワムツの人工DNAの10000, 1000, 100, 10copies/ μ Lの希釈系列から作成した。なお、定量PCRの測定結果は、サンプルごとに4ウェルの平均値を用いた。

3. 結果と考察

(1) 水路実験

10尾、16尾、24尾それぞれについての実験時の条件について表-1に示した。これらの結果から、3つの条件下において、流速、水深および水温は当初想定していた条件にほぼ相違のない結果になっていたと言える。実験開始から20分後、25分後、30分後に得られた環境DNAに

表-1 実験条件

個体数	10尾	16尾	24尾
体長(mm; mean $\pm$ SD)	56.3 $\pm$ 2.8	62.8 $\pm$ 12.5	69.4 $\pm$ 8.1
体重(g; mean $\pm$ SD)	4.94 $\pm$ 0.42	3.93 $\pm$ 1.84	5.08 $\pm$ 1.41
総重量(g)	49.35	62.91	121.94
水温($^{\circ}$ C)	16.7	16.1	17.9
流速(m/s)			
遊泳エリア	0.16	0.16	0.18
3.5m地点	0.19	0.2	0.19
水深(cm)			
遊泳エリア	7.8	8.5	8.5
3.5m地点	6.4	6.9	6.7
流量(m ³ /s)	0.0023	0.0022	0.0023

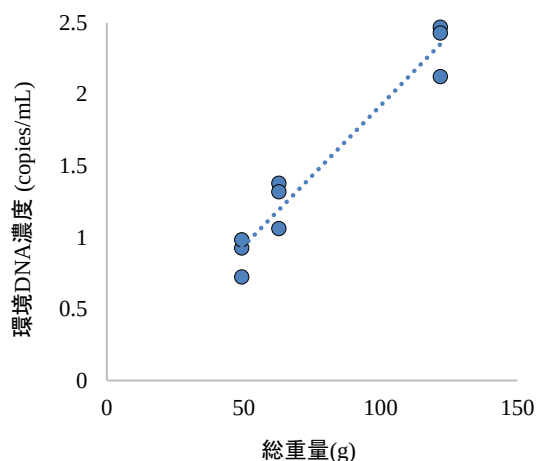


図-3 カワムツの総重量と環境DNA濃度の関係性

ついて定量PCRをおこなった結果、10尾の場合は 0.878 ± 0.137 copies/mL、16尾の場合は、 1.253 ± 0.168 copies/mL、24尾の場合は、 2.341 ± 0.188 copies/mL（平均 $\pm$ 標準偏差）となり、平均値に着目すると、個体数が増加するとともに、環境DNA濃度は増加するという結果となった。また、変動係数に着目すると、10尾の場合で0.156、16尾の場合で0.134、24尾の場合で0.081という結果となり、20分後以降は、安定した値を示していること

が明らかになった。

次に、環境DNA濃度と供試魚の総重量の関係性について図-3に示している。単回帰分析の結果、決定係数 (R^2) は0.95と高い値を示した。これまで、止水環境下における実験的研究においては、淡水魚類の量が環境DNA量と正の関係性を示す事例が報告されてきたが^{8),9),10)}、本研究結果において、流水環境中で同様の傾向を示したことから、環境DNAは、流水中の魚類の生物量を高精度に反映する指標であることが示されたと言える。

(2) 中国地方における分布特性

小瀬川、佐波川および高津川において採水したサンプルの分析結果について図-4に示している。小瀬川における結果は、6地点の平均が2.318 copies/mL、佐波川における結果は、11地点の平均が14.790 copies/mL、高津川における結果は、9地点の平均が7.740 copies/mLだった。これらの結果から、水系単位で比較すると、本研究対象の中では最も佐波川がカワムツの環境DNA濃度が高く、小瀬川が最も低かったことから、佐波川、高津川、小瀬川の順にカワムツの生息密度は高いことが予想されるが、流量や河川規模が異なる水系が異なる場合に、水系間を比較できる指標の開発については、今後の検討課題であるといえる。

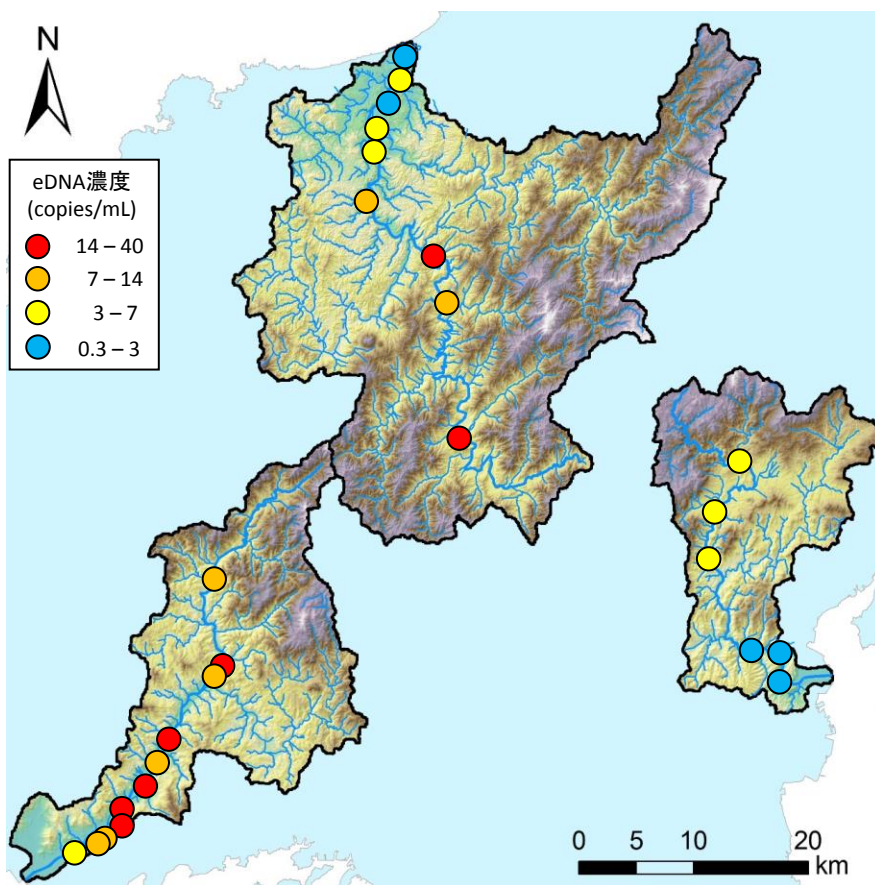


図-4 小瀬川、佐波川、および高津川におけるカワムツの環境DNAの野外調査の結果

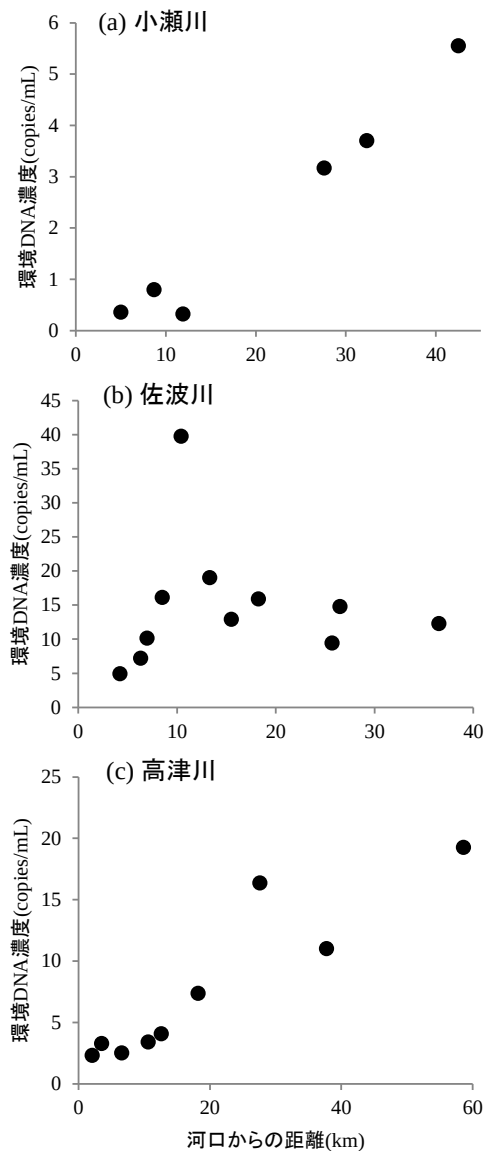


図-5 小瀬川、佐波川および高津川におけるカワムツの環境DNA濃度と河口からの距離との関係性

また、各水系内でのカワムツの流程分布傾向を明らかにするため、環境DNA濃度と河口からの距離との関係性を図-5に示している。小瀬川および高津川は、河口からの距離が大きくなるほど環境DNA濃度が高くなる、つまり上流域のほうがカワムツの生息密度が高いと予想される結果となったが、佐波川については、河口からの距離が近い、つまり下流域の環境DNA濃度が低いという点に関しては共通していたものの、河口からの距離が10.4 km付近でピークを迎え、それより上流では、環境DNA濃度はあまり変化しないという結果となった。既往の知見では、カワムツは河川の中・上流域を中心に生息することが知られているため¹²⁾、全河川の結果については妥当と言えるものの、河川によって、流程分布のパターンは一様ではないことが示唆される結果となった。

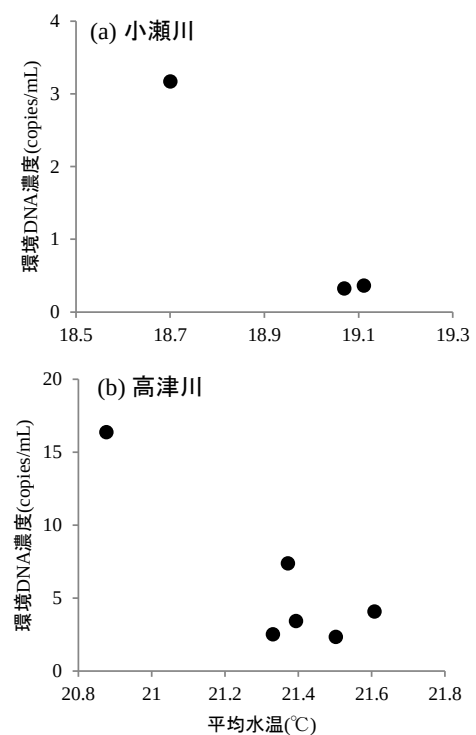


図-6 小瀬川および高津川におけるカワムツの環境DNA濃度と調査前1ヶ月間の平均水温との関係性

流程で変化する環境条件は様々であるが、それらのうち、水温との関係性に着目した結果を図-6に示している。本研究における採水地点のうち、赤松ら¹⁵⁾で設定した水温のモニタリングサイトと合致し、採水日前1ヶ月間のデータに欠測がなかった地点は、小瀬川で3地点、高津川で6地点存在したが、佐波川については2点しか存在しなかったため省略している。水温測定方法の詳細については赤松ら¹⁵⁾を参照していただきたい。これらの図から、両河川ともに、平均水温が低い地点でカワムツの環境DNA濃度が高い結果となっている。低水温域でカワムツの生物量が多くなる理由としては、魚自体の水温選好性だけでなく、水温に左右される餌資源や競合種等の生物的な環境条件や、流程によって変化する河床材料等の水温とは無関係な物理環境条件など、さまざまな理由が考えられる。よって、本研究の結果のみでは、カワムツの生物量を左右する具体的な環境条件に言及することまではできないが、本研究で構築した手法を今後河川における生物調査に用いることで、多地点における生物量の定量化が短時間で可能になると思われる。

また、河川において環境DNA分析を用いたモニタリングをおこなう際、その地点で採水した水がどの程度の影響範囲を示しているかを明らかにすることは最も大きな課題の一つである。赤松ら¹⁷⁾は、河川における環境DNA濃度の影響範囲が採水地点の上流400mから800mの間である可能性を示しており、広範囲の累積値である可

能性が少ないことを示しているが、本研究の、下流域のほう为上流域よりも環境DNA濃度が低いという結果も、環境DNAは、採水地点より上流広範囲の累積値にはなっていないことを示唆するものとなっている。流水中における環境DNAの影響範囲については、今後、流水水路でのさらなる実験や、野外での操作実験を行うことにより明確にする必要があると言える。

4. 結論

本研究では、河川に生息する純淡水魚であるカワムツを用い、流水水路における実験により、流水環境下における生物量と環境DNA量の関係性を検討した結果、環境DNA濃度と供試魚の総重量には明確な正の関係性がみられたため、環境DNAは、流水中の魚類の生物量を高精度に反映する指標であることが示された。

さらに、小瀬川、佐波川および高津川から得た水サンプルの環境DNA分析を行うことにより、各河川・各地点におけるカワムツの環境DNA量の定量化を試みた結果、水系単位で比較すると、佐波川、高津川、小瀬川の順にカワムツの環境DNA濃度は高く、また水系内で比較すると、小瀬川および高津川は、上流域のほうが環境DNA濃度が高かったことに対し、佐波川については、下流域の環境DNA濃度が低いという点に関しては共通していたものの、中流でピークを迎えるという結果となり、河川によって、流程分布のパターンは異なっていた。

今後、本研究で構築したモニタリング手法を、カワムツだけでなく多種にも拡大することにより、多地点における多種の生物量の定量化が短時間で可能になることが考えられるため、本研究成果は、生物量を考慮した河川の生態系管理に寄与するものであると言える。

謝辞：本研究は、河川・砂防技術開発助成地域課題「流域における河川水温の時空間構造変化と生態系の応答に関する研究」（研究代表者：赤松良久）、文部科学省科学研究費補助金挑戦的萌芽（研究課題番号：16K14313、研究代表者：赤松良久）および公益財団法人前田記念工学振興財団研究助成の補助を受けている。また、国土交通省中国地方整備局から貴重なデータの提供を頂いた。記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 赤松良久, 乾隆帝, 一松晃弘, 河野誉仁, 土居秀幸: 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,

- 土木学会論文集B1(水工学), Vol.73, No.4, I_1111-I_1116, 2017.
- 2) Doi H., Takahara T., Minamoto T., Matsuhashi S., Uchii K. and Yamanaka H.: Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species, *Environmental Science & Technology*, Vol.49, pp.5601-5608, 2015.
- 3) Takahara T., Minamoto T. and Doi H.: Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLOS ONE*, 8, e56584, 2013.
- 4) Thompson W. L.: Hankin and Reeves' approach to estimating fish abundance in small streams: limitations and alternatives. *Transactions of the American Fisheries Society*, Vol.132, pp.69-75, 2003.
- 5) Yamanaka H. & Minamoto T.: The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, Vol.62, pp.147-153, 2016.
- 6) 山中裕樹, 源利文, 高原輝彦, 内井喜美子, 土居秀幸: 環境DNA分析の野外調査への展開, *日本生態学会誌*, 66, pp.601-611, 2016.
- 7) Doi H, Inui R., Akamatsu Y., Kanno K., Yamanaka H., Takahara T. and Minamoto T.: Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish, *Freshwater Biology*, Vol.62, pp.30-39, 2017.
- 8) Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. and Kawabata, Z.: Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA, *PLoS ONE*, Volume 7, pp.1-8, 2012.
- 9) Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., and C. Paukert: Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*, *Biological Conservation*, 183, pp.77-84, 2015.
- 10) Eichmiller, J. J., Miller, L. M. and Sorensen, P. W.: Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish, *Molecular Ecology Resources*, 16, pp.56-68, 2016.
- 11) 中坊徹次編: 日本産魚類検索 全種の同定 第三版, 東海大出版会, 2013.
- 12) 川那部浩哉, 水野信彦, 細谷和海 (編・監修), 改訂版 日本の淡水魚, 山と溪谷社, 2005.
- 13) 河川環境データベース : <http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/>
- 14) 福岡有紗, 高原輝彦, 松本宗弘, 兵庫県立農業高校生物部, 丑丸敦史, 源利文: 在来希少種カワバタモロコの環境DNAによる検出系の確立, *日本生態学会誌*, 66, pp.613-620, 2016.
- 15) 赤松良久, 河野誉仁, 乾隆帝, 宮本仁志: 中国地方一級河川における河川水温変動特性, 土木学会論文集B1(水工学), Vol.73, No.4, I_1207-I_1212, 2017.

(2017.4.3受付)