

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～

MONITORING THE USE OF ARTIFICIAL SPAWNING GROUNDS FOR
Plecoglossus altivelis altivelis AT THE NAHARI RIVER –FOCUSING ON THE
COMPARISON BETWEEN VISUAL SURVEY AND ENVIRONMENTAL DNA
ANALYSIS–

乾 隆帝¹・高橋 勇夫²・後藤 益滋³・赤松 良久⁴・河口 洋一⁵
Ryutei INUI, Isao TAKAHASHI, Masuji GOTO, Yoshihisa AKAMATSU, Yoichi KAWAGUCHI

¹正会員 農博 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非会員 農博 たかはし河川生物調査事務所代表 (〒781-5603 高知県香南市夜須町西山627)

³正会員 工博 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)

⁴正会員 工博 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)

⁵正会員 学術博 徳島大学大学院准教授 理工学研究部 (〒770-8506 徳島市南常三島町2-1)

Establishment of an artificial spawning ground was started in 2003 at the Nahari River that flowing in the southeastern part of Shikoku, Kochi Prefecture, Japan, as an effort to conserve the natural resources of *Plecoglossus altivelis altivelis*. The results of the resource survey show that the number of drifting larvae increased remarkably and the number of upstream migrating juveniles increased and stabilized since 2005. The results of the survey of spawning in artificial spawning grounds show that *P. altivelis altivelis* uses the artificial spawning grounds as the main spawning ground every year. In addition, the results of environmental DNA analysis show high eDNA concentration in the samples downstream of the artificial spawning ground during the spawning season. Furthermore, during the peak spawning season, the eDNA concentration of the nighttime sample was approximately 25-fold higher than that of the daytime sample downstream of the artificial spawning ground.

Key Words : eDNA, river management, freshwater, fishery, sweetfish, amphidromous fish

1. はじめに

アユは河川における漁業対象として最も重要な種の一つであるが、漁獲量は全国的に減少傾向であり¹⁾、特に西日本においての減少は顕著である²⁾。

アユは秋に河川下流域で孵化した仔魚が海域に流下し、海域生活を経た後、春に河川に遡上し、秋に産卵して死亡する回遊性の年魚である。よって、減少要因を解明する上で、生活史段階のそれぞれに着目する必要があるが、近年、アユにとって好適な産卵場の減少が資源量減少の要因となっている可能性が示唆されていることや³⁾、西日本のいくつかの河川において、仔魚の海域への流下時期と回帰率の関係性が示唆されていることから⁴⁾、西日

本の河川においては、産卵～ふ化期における何らかの要因がアユの資源量を減少させていることが多いと考えられる。よって、西日本におけるアユの資源量を回復させるためには、産卵～ふ化期における負の要因を解明し、可能な限りそれらを取り除くことが急務である。

そこで本研究では、2003年から天然アユ資源を保全するための取り組みが実施されている高知県東部を流れる奈半利川において、10年以上にわたって流下仔魚量調査と、潜水目視による遡上終期の幼魚の個体数調査および秋季の卵の分布調査をおこなうことにより、産卵場造成が資源量に及ぼす効果の検証を試みた。

また、これまでのアユを対象とした環境DNA分析による先行研究により、河川水中に含まれるアユのDNAが、その箇所に生息するアユの生物量(個体数や現存



図-1 産卵場の造成（砂利投入の様子）

量）と強い関係性があること⁵⁾、さらに中国地方の2河川におけるアユの秋季における降下動態に関する研究の中で、主要産卵場となっていると推定されるエリアで産卵期に検出される環境DNA濃度が非常に高くなることから、アユの産卵状況のモニタリングに環境DNA分析が有用であることが示唆されていた⁶⁾。よって本研究では、前述した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。

2. 奈半利川における産卵場造成

奈半利川は電源開発が積極的に行われた河川で、中上流に昭和30年代に3つのダムが建設された。河川水は発電のために高度に利用されており、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^{7,8)}。このように奈半利川は、アユが正常に生息するには厳しい環境にあり、実際に1990年代後半には資源量は大きく減少していた。

天然アユ資源を保全するための取り組み（実態調査と対策の検討・実施）は2003年から始まった。この当時、ダムによる河床のアーモークート化がアユの産卵域である下流部にまで進行しており、産卵に不可欠な浮き石の小砂利底はほぼ消失していた。そのため、2005年から産卵期初期の10月下旬～11月上旬に産卵場の造成を始めた。造成位置は河口から1.1～1.2km付近で、造成面積はその年の川の状態や親魚の多さによって多少変わるものの、概ね1,200～1,500m²であった。造成の手順は以下のとおりである。まず、重機（バックホー）を使って左岸側の砂州を水際に沿うように延長100～120m、幅12～13mの水路状に掘削する。次に、奈半利川の河口で採取し、プラントでふるいにかけた砂利をアユの産卵に好適な粒径組成に混合したうえで産卵場に投入、敷設する（図-1）。砂利投入は造成地の河床に産卵に好適な径5～50mmの礫

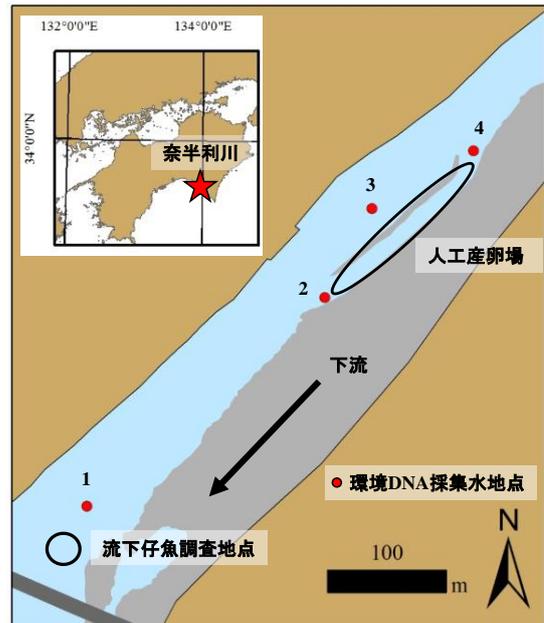


図-2 奈半利川の人工産卵場周辺での調査地点。水色部分は平常時の水面を示している

が少ないために行った措置である。最後に、重機および人力で造成面を平坦に均して完了となる。近年では造成が完了した直後（16:00頃に完了し、その1時間以内）にアユの産卵行動が観察されることが多い。

また、アユの産卵盛期中は産卵しやすいように、発電使用水量の調整によって河川の水位をできるだけ一定に保つという対策も取られている。さらに、産卵場造成と並行して、安定した再生産のために必要な親魚数21万尾⁸⁾（川の規模から必要な親魚数を算定した）を確保するために、夏から秋にかけていくつかの漁獲規制（投網の禁漁区設定、産卵保護期間の延長、産卵保護区域の設定等）を漁協が自主的に設けた。

3. 方法

(1) アユ資源量の年変動調査

a) 流下仔魚調査

奈半利川ではアユの産卵は10月中旬～12月下旬に行われ、仔魚のふ化（流下）は10日～1ヶ月後の10月下旬から1月下旬に及ぶ。アユ仔魚の採集は、2003～2018年の10月下旬～1月下旬にかけて、原則として1回/週の頻度で、口径0.5m、網目0.3mmのプランクトンネットを用いて行った。採集地点は奈半利川河口から約0.8km上流の瀬（流心付近）で、感潮域の上流端に位置する。仔魚の採集時刻は、主産卵場からの距離が0.2～0.7kmと近いことと、アユ卵のふ化のピーク時刻が18:00～19:00であること⁹⁾を考慮して、18:30～19:00（この間で1回：2～5分）とした。ネットの濾水量はネット前面に取り付けた濾水計（離合社製5571-A）から求めた。採集したアユの



図-3 人工産卵場に産み付けられたアユ卵（卵径約1mm）
（密度階級4：2017年11月25日撮影）

仔魚は5%ホルマリン溶液で固定後、個体数を計数した。

アユ仔魚の流下密度（ n/m^3 ）は採集個体数を濾水量で除して求め、流下数は（ n/s ）流下密度に調査時の河川流量を乗じた。流量は調査の1.5時間前の長山発電所発電使用水量を基準に、平鍋ダム残留域からの調査期間における平常時の流入量の推定値（ $2m^3/s$ ）を合算した値を用いた。なお、この推定値については、ダムを管理している電源開発の意見を参考にして仮定（算出）したものである。

b) 潜水目視調査

遡上終期（アユ漁解禁直前）におけるアユの個体数の調査を2004～2017年の5月中～下旬に天然アユの遡上範囲である河口～平鍋ダム（河口から約23km）の間において潜水目視により行った。ただし、2016年は河川工事の濁りが続き、調査ができなかった。調査区間のうち河口から田野堰（河口から3km）の間はすべての河床型で連続的に調査し、それより上流は瀬と淵の分布に偏りが生じないように調査地点を選択し、断続的に調査した。調査区間の全河床数に占める観察対象とした河床数の割合は30～33%であった。潜水目視を行った河床型ごとのアユの生息密度は、確認個体数を観察面積（観察幅×距離）で除することで算出した。

このようにして得た河床型ごとの生息密度（透明度を考慮した発見率¹⁰）による補正後の値）に、河床型の水面面積（2005年に全域の面積を実測、2008、2011、2015～2017年に部分的に再測量）を乗じて、個々の河床型における生息数を算出した。潜水目視を行わなかった河床型の生息数は、最寄りの同じ河床型の生息密度を用いて推定した。これら河床型ごとの生息数の和をその調査時におけるアユの生息数とした。なお、この生息数には天然遡上アユだけでなく調査前に放流された人工アユも含まれているが、放流から調査時までの減耗率は年によって大きく変化することが考えられたため、天然遡上数の推定は行わなかった。

(2) 人工産卵場における卵の分布調査

人工産卵場および自然産卵場におけるアユ卵の分布調査については、2005～2016年は原則として、造成後2～3

週間後に1回行った。2017年は人工産卵場でのみ造成1日後の11月10日、および16日後の11月25日の2回調査し、自然産卵場では11月25日に1回調査した。

潜水目視による産着卵の分布密度の観察は、人工産卵場（幅12～13m、長さ100～120m）では縦断方向に10m毎に設けた横断側線上の4点（2017年の場合は幅が13mであったため、左岸から2m、5m、8m、11mの位置とした）で行った。1点あたりの観察範囲は概ね0.3×0.3mで、産着卵の密度を0（なし）～4（非常に多い）の5段階に評価し（図-3）、記録した。自然産卵場では産卵範囲の上流端から下流端までに10m毎に横断側線を設け、横断側線上で1～3mピッチに人工産卵場と同様の方法で卵密度の潜水目視観察を行った。得られた卵密度のデータをもとに卵分布のコンター図を作成した。さらに、卵の分布調査の前後に3～6回、人工産卵場および天然産卵場においてアユの産卵行動と定性的な卵密度の観察も行った。

(3) 環境DNA分析による産卵状況評価の検証

先の結果でも述べるが、2005年～2016年の卵の分布調査によって得られた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。よって本研究では、人工産卵場の下流において産卵期に採水したサンプルから検出される環境DNA濃度と、他の対照区で採水したサンプルから検出される環境DNA濃度を比較することにより、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。

野外調査は、2017年10月から12月にかけて4回おこなった。10月7日および11月29日の2回については日中（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¹¹、産卵期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（地点2）、下流の対照区（地点1）、人工産卵場近傍の本流の対照区（地点3）、上流の対照区（地点4）の4箇所を設定し（図-2）、これらの地点において、表層水1Lを採集し、DNAの分解を阻害するために塩化ベンザルコニウム溶液（w/v%で10%の濃度）を1Lあたり1mL入れた後、クーラーボックスに入れ、冷却して持ち帰った。また、輸送時のDNAの混入を確認するために、輸送時のクーラーボックスの中に脱イオン水を入れクーラーブランクとした。なお、採水に用いるボトルは、次亜塩素酸ナトリウム漂白剤（市販製品を10倍希釈したもの）で洗浄し、DNAを含まない脱イオン水によって洗浄した。サンプル水は、冷却して持ち帰った後、採水から48時間以内に、GF/Fガラスフィルター（pore size c. 0.7 μm ; GE Healthcare）で濾過

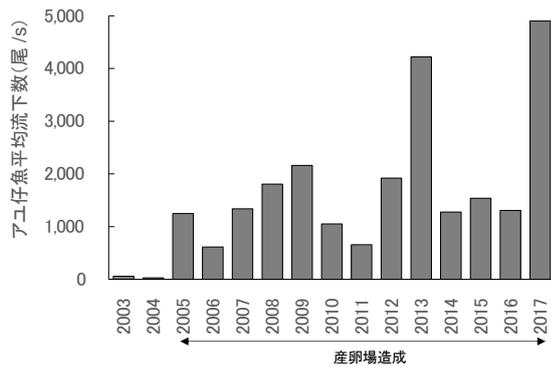


図-4 アユ仔魚の平均流下量の年変化

し、アルミホイルで包んで -20°C で凍結保存した。クーラーブランクは、濾過時のDNAの混入を確認するためのブランクとともに、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、Doi *et al.*⁵⁾に従い、サリベットチューブ(Sarstedt,)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。抽出したDNAのサンプルは、quantitative PCR (qPCR) を用い、PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)によって定量PCRをおこなった。定量PCRをおこなう際、アユに特異的なプライマーおよびTaqMan 蛍光プローブについては、Yamanaka&Minamoto¹²⁾と同様のものを使用した。また、標準試料として、PCRごとにプラスミドによってクローニングされたアユの人工DNA¹¹⁾、30000、3000、300および30 copies について測定し、それらの結果から検量線を作成することによりサンプルの定量化をおこなった。

4. 結果と考察

(1) アユ資源量の年変動

a) 流下仔魚

2003～2017年における調査期間中(10～1月)のアユ仔魚の平均流下量を図-4に示している。平均流下量は産卵場を造成する前の2003～2004年は28～59尾/sと低水準であったが、産卵場を造成して以後、615～4,902尾/sと大きく増加した。このような仔魚量の増加には親魚数の増加も影響しているものの、産卵場の造成を行った2005年以降に著しく増加したことは、造成の効果(好適な産卵環境の提供による卵の流失や食害等の軽減)が大きかったことを窺わせる。

b) 5月時点での生息数

アユ漁が解禁される直前の5月中・下旬時点での平鍋ダム下流でのアユの推定生息数は15～192万尾の間で変化し(図-5)、2009年以降は大きな年変動を伴いながらも増加傾向が認められた。2009年以降の稚アユの放流量は漁協の資料によると5(2017年)～25万尾(2015年)で、仮に放流後の減耗率を0%としても、生息数の3～

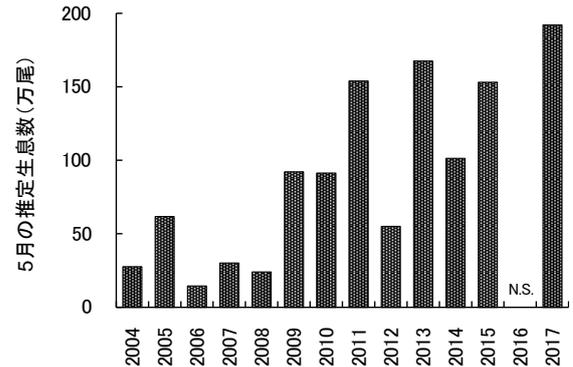


図-5 5月時点でのアユの生息数の年変化。2016年は濁りのために調査ができなかった

21%を占めるに過ぎなかった。したがって、2009年以降の生息数の増加は、主に天然遡上量の増加によるものと判断される。

しかしながら、産卵場造成に伴いアユ仔魚の流下量が2005年以降に急増したにもかかわらず、造成を始めた当初は、それが翌年5月の生息数の増加に結びつかなかった。例えば、産卵場造成が始まった2005年の流下数はそれ以前に比べて著しく増加したが(図-4)、それらが遡上した2006年の生息量はそれ以前と比べてむしろ減少し、その状態は2008年まで3年間続いた(図-5)。この3年間の停滞は12月上旬までにふ化した「早生まれ」の海域での生残率が著しく低く、流下量の増加が遡上量の増加に結びつかなかったためであった^{3,13)}。そのため、2008年以降は産卵場造成時期をそれまでの10月下旬から11月上旬に2週間程度遅らせることで、人工産卵場での産卵期を遅らせ、海域での生残率の向上を図った。この対策は2009年以降の生息量(遡上量)の増加に寄与したと考えられた。

(2) 産卵場における卵の分布調査

2017年11月時点での人工産卵場におけるアユ卵の分布状態を図-6に示している。11月10日(造成1日後)では、卵の密度階級1(少ない)の範囲が広いものの、すでに階級4(非常に多い:図-3)に達したエリアも認められた。一方、階級0(なし)の範囲はごく狭く、造成直後からほぼ全面でいっせいに産卵が始まったことが窺えた。造成16日目の11月25日では産卵範囲が造成面(砂利を投入した図-6の直線区間)の上下にまで拡大するとともに、造成面では階級4の範囲が全体の半分以上に拡大していた。造成面の上下を含めた産卵面積は約2,200m²であった。人工産卵場では造成を始めた2005年以降、出水によって敷設した砂利とともに産着卵が流された年を除けば、2017年と同様に造成面のほぼ全面での産卵が確認されている。

自然産卵場は2005～2017年の間、河口から0.7～2.6kmの間で確認されたが、規模の大きな産卵場は1.5km付近

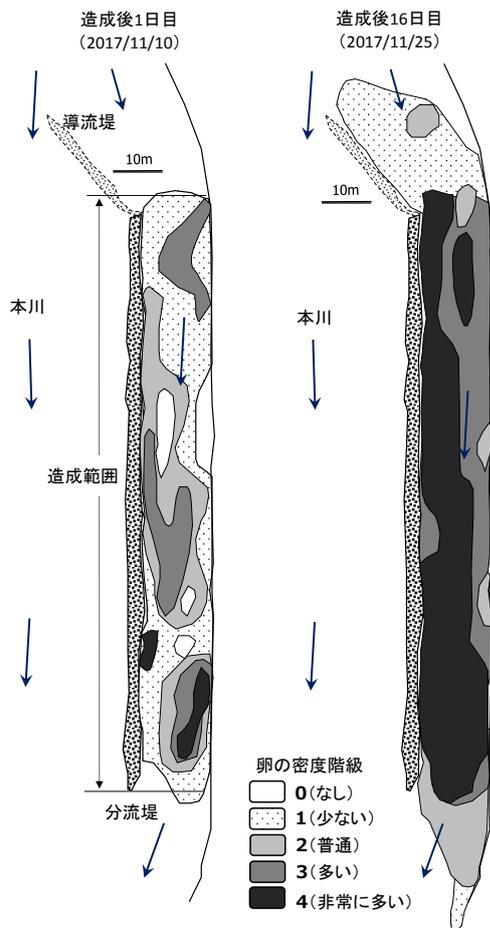


図-6 2017年11月における人工産卵場でのアユ卵の分布
(図中の矢印は流向を示す)

の瀬（人工産卵場から約0.3km上流）に形成されることがほとんどで、2017年も1.4～1.5kmの間にのみ形成された。2017年11月25日における自然産卵場の面積は3,200㎡で、同日調査した人工産卵場よりも広がった。アユ卵の分布密度は人工産卵場よりもかなり低く、階級1の範囲が全体の半分以上を占めた。また、人工産卵場で広く観察された階級4の範囲は確認できなかった。

このように人工産卵場と自然産卵場を比較すると、産卵面積は年によって自然産卵場が広いことはあるものの、卵密度は一貫して人工産卵場で圧倒的に高かった。また、産卵場の造成の前後で実施した産卵行動と卵密度の観察から、自然産卵場での産卵は人工産卵場が完成した直後から不活発または停止することが多いことが分かっている。さらに、上述のとおり、人工産卵場では完成当日から活発な産卵が始まることが多いことも考え合わせると、下流部までアーマーコート化が進行している奈半利川では、アユ親魚は自然産卵場よりも人工産卵場を選択する傾向が強いと言える。

(3) 環境DNA分析による産卵状況評価の検証

a) 日中のデータを用いた時系列比較

図-7に各調査日における日中の分析結果を示している。

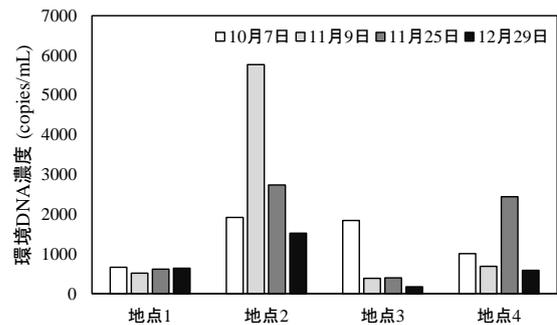


図-7 昼間採水サンプルから得られた環境DNA濃度の時系列変化

各調査回での環境DNAの平均濃度は、10月7日は1357±622copies/mL、11月9日は1837±2622 copies/mL、11月25日は1546±1210 copies/mL、12月29日は730±569 copies/mLとなり（平均±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蟻集が明らかになることが示された。

b) 日中と夜間の比較

図-8に夜間に採水をおこなった11月9日および11月24日の分析結果を示している。11月9日は、3904±3805copies/mL（平均±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±34169copies/mL（平均±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蟻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蟻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。翌日（11月10日）におこなった潜水目視による産着卵の分布密度の観察の結果では（表-1）、卵は人工産卵場において明らかに密度が高かったことから、日中から産卵場に蟻集する場合は、日中、夜間ともに環境DNA濃度が高くなる可能性があるということが示唆される結果となった。

産卵盛期である11月24日から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（68602copies/mL）に増加した。翌日（11月25日）におこなった潜水目視による産着卵の分布密度

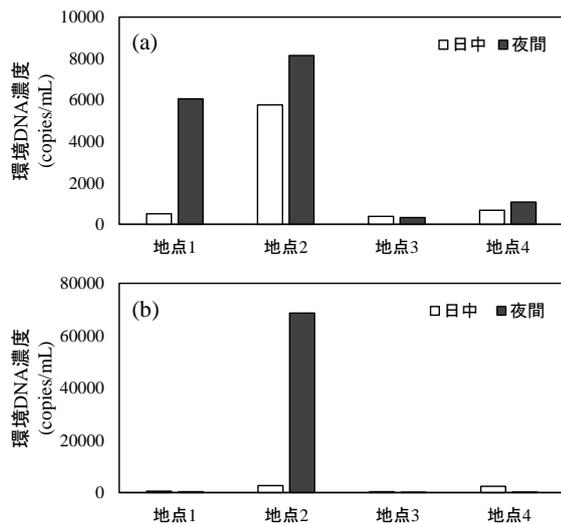


図-8 環境DNA濃度の昼夜間比較。(a)11月9日、
(b)11月24日から25日

表-1 環境DNA濃度の採水地点上流部の産卵密度。地点2については人工産卵場内の平均値を示している。

	地点1	地点2	地点3	地点4
11月10日	0	1.65	0	0
11月25日	0	3.69	0	0

の観察の結果では、卵は人工産卵場において顕著に密度が高かったことから(表-1)、人工産卵場を造成して約2週間後の産卵盛期には、アユが夜間に産卵場に蟄集し産卵し、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を示す結果となった。

5. 結論

奈半利川における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、人工産卵場は毎年ほぼ全面での産卵が確認されるとともに、産卵場を造成した直後から人工産卵場に親魚が集中する様子も観察された。これらのことから、産卵環境の悪化した奈半利川では、産卵場造成は、天然アユ資源を増加・安定させるために有効な手段の一つであると判断された。

また、環境DNA分析の結果、昼間の環境DNA濃度は産卵盛期である11月下旬にかけて増加し、その後減少すること、そして日中と夜間の比較により、産卵盛期である11月下旬においては、人工産卵場の直下の地点の環境

DNA濃度が日中の約25倍に増加することが示された。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蟄集を、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。

本研究は、アユの積極的な資源増殖の有用性を定量的に検証した稀有な例であり、また、それらの蓄積されたデータがあったからこそ、環境DNA分析の有用性の検証が可能であった。今後は、環境DNA分析を潜水調査が難しい河川に適用し、全国的なアユ資源の減少要因を解明するためのデータの集積に繋がりたいと考えている。

謝辞：本研究は、公益財団法人河川財団河川基金「環境DNAを用いたアユの産卵場モニタリング手法の構築と好適産卵環境の把握」(研究代表者：乾 隆帝)の一環として行った。調査にご協力いただいた奈半利川淡水漁協および電源開発株式会社に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 農林水産省統計部：全国年次別・魚種別生産量(平成16年～26年)、平成26年漁業・養殖業生産統計、2016。
- 2) 高橋勇夫：天然アユが育つ川、築地書館、2009。
- 3) 高橋勇夫、東健作：天然アユの本、築地書館、2016。
- 4) Takahashi I., Azuma K., Hiraga H. and Fujita S.: Different mortality in larval stage of ayu *Plecoglossus altivelis* in the Shimanto Estuary and adjacent coastal waters, *Fisheries Sci.*, Vol.65, No.2, pp. 206-211, 1999.
- 5) 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*, 62, pp.30-39, 2017.* 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、第23巻、pp.669-674、2017。
- 7) 高橋勇夫：アユ—持続的資源の非持続的利用、変容するコモンズ(新保輝幸・松本充郎編)、pp. 83-102、ナカニシヤ出版、2012。
- 8) 高橋勇夫：アユを増やすために具体的目標を設定する、アユを育てる川仕事(古川彰・高橋勇夫編)、pp. 133-139、築地書館、2010。
- 9) 田子泰彦：庄川におけるアユ仔魚の降下生態、水産増殖、Vol.47, No.2, 201-207, 1999。
- 10) 高橋勇夫、岸野底：奈半利川におけるアユの生息数と減耗率の潜水目視法による推定、応用生態工学、Vol.19, No.2, pp. 233-243, 2017。
- 11) 松井魁：鮎。法政大学出版局、1986。
- 12) Yamanaka H. and 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。
- 13) 高橋勇夫：天然アユを増やす河川整備、日本水産学会誌、Vol.76, No.3, pp. 414-415, 2010。

(2018. 4. 3受付)