

# 環境DNA分析を用いたアユ産卵場の適切なモニタリング手法の構築～時間的検討を中心に～

EXAMINATION OF AN APPROPRIATE METHOD TO MONITOR THE SPAWNING GROUND OF *Plecoglossus altivelis* USING ENVIRONMENTAL DNA –FOCUSING ON TIMELY EXAMINATION–

乾 隆帝<sup>1</sup>・河野 誉仁<sup>2</sup>・赤松 良久<sup>3</sup>・後藤 益滋<sup>4</sup>・山口 皓平<sup>5</sup>  
Ryutei INUI, Takanori KONO, Yoshihisa AKAMATSU, Masuji GOTO, Kohei YAMAGUCHI

<sup>1</sup>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)  
(現所属 福岡工業大学准教授 社会環境学部 (〒811-0295 福岡県福岡市東区和白東3-30-1))

<sup>2</sup>学生会員 工修 山口大学大学院生 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

<sup>3</sup>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)

<sup>4</sup>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)  
(現所属 現所属 日本工営中央研究所副参事 総合技術開発第2部  
(〒300-1259 茨城県つくば市稲荷原2304番地))

<sup>5</sup>学生会員 工学 山口大学大学院生 創成科学研究科 (〒755-8611 山口県宇部市常盤台2-16-1)

The resources of *Plecoglossus altivelis*, the most important fishery target species in Japanese rivers, have been recently decreasing. A simple method to monitor spawning ground is required to conserve *P. altivelis* resources. In this study, we conducted: (1) five daytime samplings of environmental DNA (eDNA) at six sites during the spawning season of 2017; and (2) continuous samplings of eDNA at one site for three days from 15:00–22:00 during the spawning season of 2018. Our results showed that, even in the high spawning season, the values of eDNA concentration and flux may be small on some days, and the main spawning ground may change during the season. Moreover, we found that *P. altivelis* was more likely to be actively spawning on days with high tide fluctuations, and eDNA concentration was highest approximately 45 minutes after sunset on the day of high spawning activity.

**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<sup>1)</sup>、特に西日本においての減少は顕著である<sup>2)</sup>。

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から<sup>3)</sup>、アユの産卵状況を簡易的にモニタリングする技術を開発

した上で、アユの産卵に影響を与え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。これまで、アユの降下産卵期に着目した環境DNAの研究としては、河野ら<sup>4)</sup>による中国地方の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や、乾らの研究<sup>5)</sup>により、日中の環境DNA濃度を時系列で比較することにより、アユの降下動態を、日中と夜間の環境DNA濃度を比較することにより、アユの好適産卵場を解明できることが示されている。しかしながら、アユの産卵期において、どのような日のどのような時間帯にモニタリングをおこなうのが最も適切であるかについての知見はない。

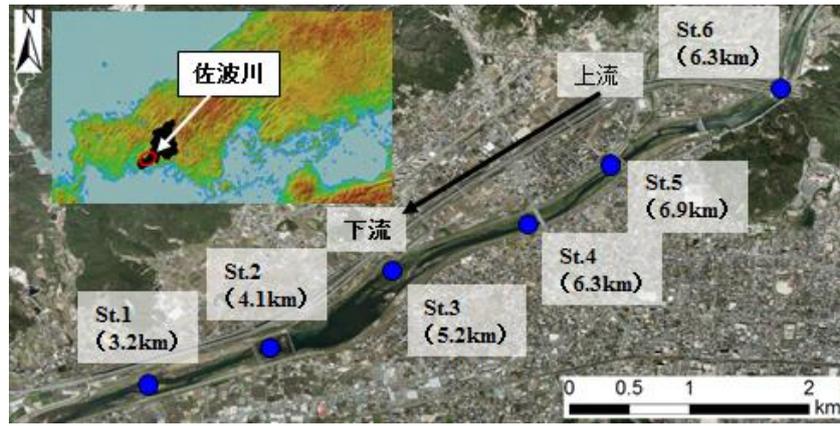


図-1 佐波川における調査地点。2017年の産卵盛期前後における昼間濃度の比較は全地点において、2018年の産卵盛期における日による産卵活性の違いと主要産卵時間帯の検討はSt.2でおこなった。括弧内は河口からの距離を示している

そこで本研究では、環境DNAを用いたアユの産卵場モニタリングに最適な方法を検討することを目的に、(1) アユの産卵盛期前後における複数箇所での昼間濃度の比較と、(2) アユの産卵盛期における複数日において産卵場の下流の定点における環境DNA濃度の連続モニタリングをおこなうことにより、適切なモニタリング時間を明らかにすることを試みた。

## 2. 方法

### (1) 対象河川

佐波川は山口県のほぼ中央に位置し、周防灘に注ぐ幹線流路延長56km、流域面積460km<sup>2</sup>の一級河川である。流域の土地利用は山地が約90%を占め、谷底平野と下流部の三角州および干拓地に農耕地が開けている。佐波川本流の国管理区間内には15基もの堰が存在していることが特徴の一つである。これらの河川では、河野ら<sup>4)</sup>の研究によって、2016年においては11月10日前後が産卵盛期である可能性が高いこと、その時期には河口から3～4km付近の濃度が高いため、この付近が主要産卵場である可能性が高いことが明らかになっていた。

### (2) 調査方法

#### a) 産卵盛期前後における昼間濃度の比較

調査は、河野ら<sup>4)</sup>の研究において、2016年の佐波川において産卵盛期であると推察された11月中旬前後に、複数地点において昼間に複数回の調査をおこない、環境DNA濃度およびフラックスの時空間変化を明らかにすることを試みた。図-1に佐波川における調査地点を示す。2017年11月2日(大潮, 月齢13.3), 7日(中潮, 月齢18.3), 14日(若潮, 月齢25.3), 21日(中潮, 月齢2.6), 12月3日(大潮, 月齢14.6)の5回、各地点ともに、昼間に瀬の下流側において、表層水1Lをボトルを用いて

採集し、環境DNAの分解を防ぐ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<sup>6)</sup>、クーラーボックスに入れ、冷却して持ち帰った。なお、山口ら<sup>7)</sup>の研究により、アユの環境DNAの大半は数十mで沈降することが示されているので、本研究で得られた値は、採水地点直上の瀬の評価となることを想定している。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、採水ボトルに脱イオン水を入れたクーラーブランクを入れた。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。また、調査期間において、St.2(河口から4.1km付近)およびSt.4(河口から6.3km付近)の河床面付近において、赤松ら<sup>8)</sup>に従い、設置式水温ロガー(HOBO WaterTemp Pro V2)を用いて、15分間に1回の間隔で水温を測定した。

#### b) 産卵盛期における日による産卵活性の違いと主要産卵時間帯の検討

環境DNAを用いた適切なアユの産卵モニタリングのためには、アユの産卵期間中における主要産卵時間帯を把握すること、そして、日による産卵活性の違いを明らかにする必要がある。そこで、2018年11月6日(大潮, 月齢28.0), 10日(中潮, 月齢2.5), 15日(小潮, 月齢7.5)に、佐波川のSt.2(図-1)において、15時から22時の間、毎時0分に8回採水をおこなった。採水方法は2017年の調査同様、瀬の下流側において、表層水1Lをボトルを用いて採集し、環境DNAの分解を防ぐ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<sup>6)</sup>、クーラーボックスに入れ、冷却して持ち帰った。また、採水地点付近の河床面において、設置式水温ロガー(HOBO WaterTemp Pro V2)を用いて、1分間に1回の間隔で水温を測定した。

#### c) 環境DNA分析

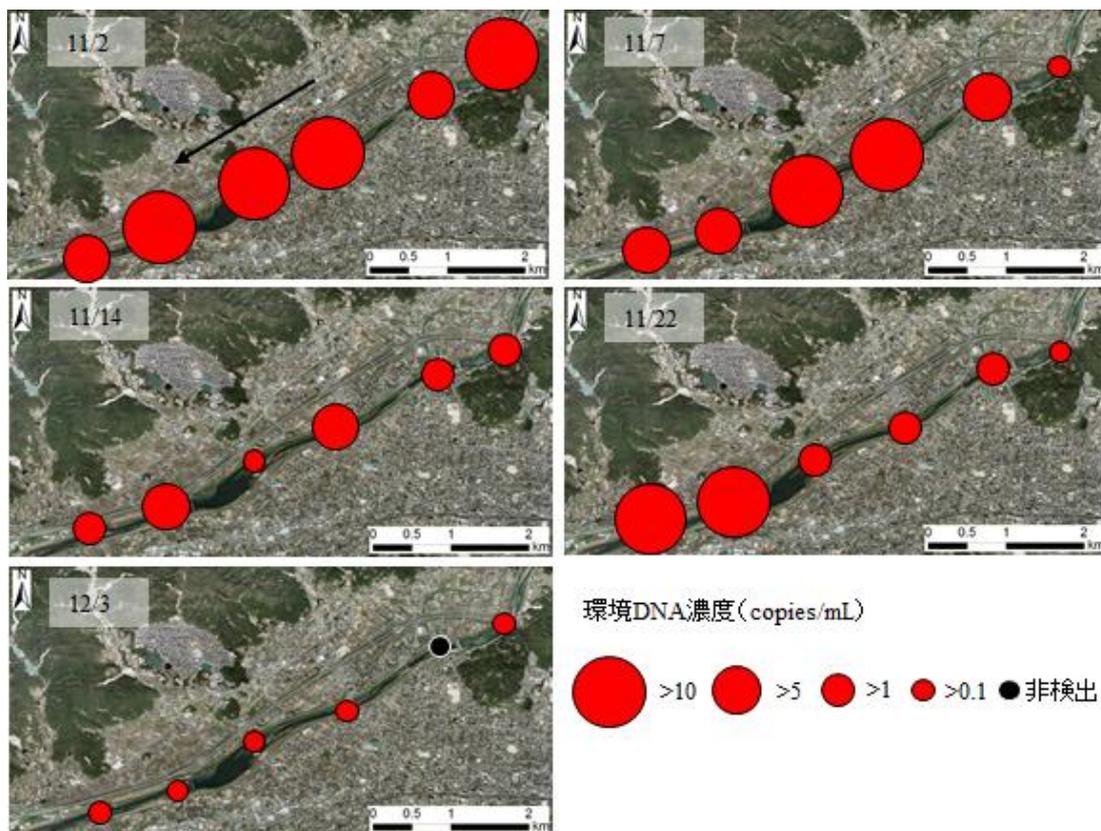


図-2 2017年の佐波川におけるアユの環境DNA濃度の結果

サンプル水は、冷却して持ち帰った後、採水から24時間以内に、GF/Fガラスフィルター(pore size c. 0.7  $\mu\text{m}$ ; GE Healthcare)で濾過し、アルミホイルで包んで $-20^{\circ}\text{C}$ 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.*<sup>9)</sup>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&Minamoto<sup>10)</sup>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DNA<sup>11)</sup>、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。

### 3. 結果

#### (1) 産卵盛期における昼間濃度の比較

2017年の佐波川におけるアユの環境DNA濃度を図-2に、環境DNAフラックスの結果を図-3に示している。

なお、調査各日の日平均流量は、新橋観測所において、11月2日は $14.7 \text{ m}^3/\text{s}$ 、11月7日は $9.5 \text{ m}^3/\text{s}$ 、11月14日は $6.5 \text{ m}^3/\text{s}$ 、11月22日は $5.7 \text{ m}^3/\text{s}$ 、12月3日は $4.0 \text{ m}^3/\text{s}$ だった。

全地点の環境DNA濃度およびフラックスの平均値の推移をみると、11月2日は $19.88 \text{ copies/mL}$ および $300.64 \times 10^6 \text{ copies/s}$ 、11月7日は $12.97 \text{ copies/mL}$ および $122.25 \times 10^6 \text{ copies/s}$ 、11月14日は $3.54 \text{ copies/mL}$ および $23.16 \times 10^6 \text{ copies/s}$ 、11月22日は $13.41 \text{ copies/mL}$ および $76.42 \times 10^6 \text{ copies/s}$ 、12月3日は $0.14 \text{ copies/mL}$ および $0.57 \times 10^6 \text{ copies/s}$ となった。これらの結果から、環境DNA濃度およびフラックスは、11月14日と12月3日の2回、前回調査と比較して減少する傾向がみられた。図-4にSt.2およびSt.4の水温を示しているが、12月3日については、日平均水温が $10.6^{\circ}\text{C}$ を下回っているため、産卵期のピークが過ぎた、あるいは産卵期が終了した可能性が高いと考えられる。一方、11月14日は日平均水温が $14.7^{\circ}\text{C}$ と、比較的高水温であること、そして11月22日に再び環境DNA濃度およびフラックスが増加していることから、産卵盛期中であっても、環境DNA濃度およびフラックスの値が小さい日が存在する可能性があることが明らかになった。このような結果になった理由としては、11月7日の産卵個体群が産卵した後、11月22日に新たな産卵個体群が加入したのか、あるいは、同じ個体群が存在していても、日によって環境DNA放出量が異なるのかの両者が考えられるが、現状では不明である。

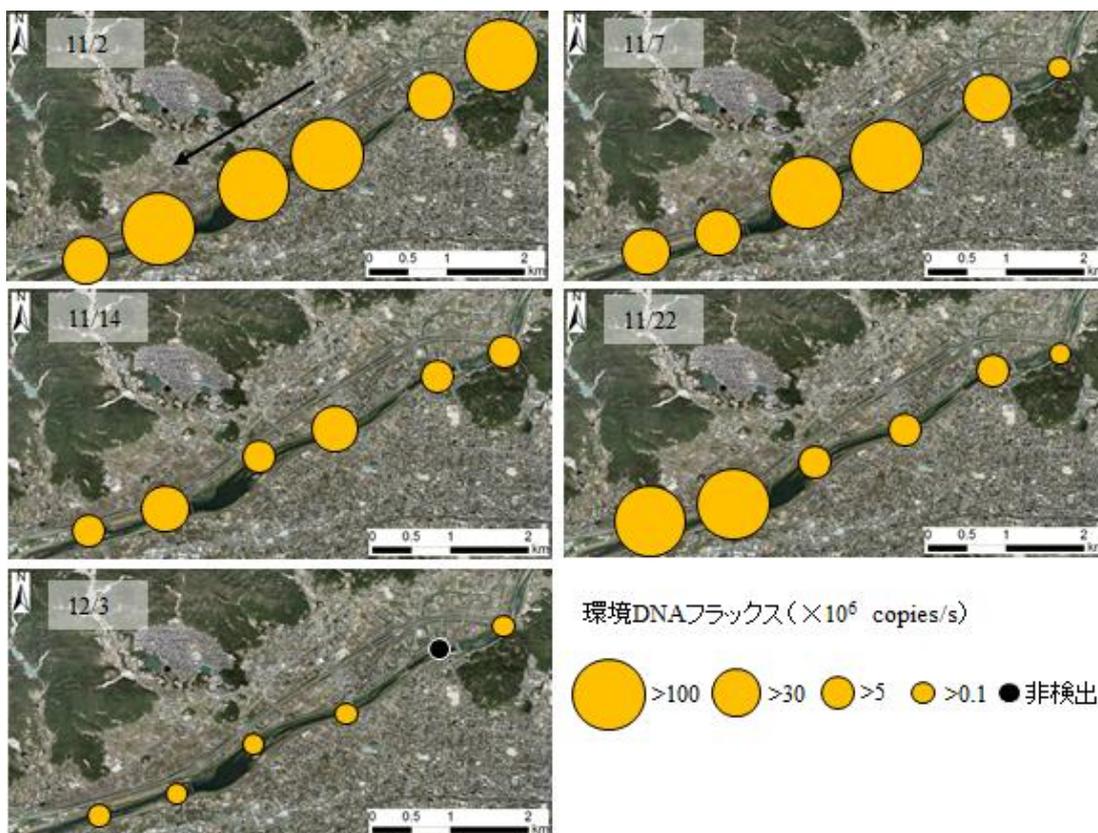


図-3 2017年の佐波川におけるアユの環境DNAフラックスの結果

図-5に、各調査日の環境DNA濃度および環境DNAフラックスをまとめている。11月2日および7日は、St.3（河口から5.2km）より上流の環境DNA濃度およびフラックスの値が相対的に大きかったことに対し、11月22日は、St.2（河口から4.1km）より下流の環境DNA濃度および環境DNAフラックスの値が相対的に大きかった。産卵域の広い河川では産卵期間中に主要産卵域が次第に下流に移行することが知られているが<sup>11)</sup>、佐波川においても、11月上旬から下旬にかけて、同様の現象が生じている可能性が高い。今後、好適産卵時間帯である可能性が高い夜間における採水調査も併せておこなうことにより、詳細を解明することが出来るようになるであろう。

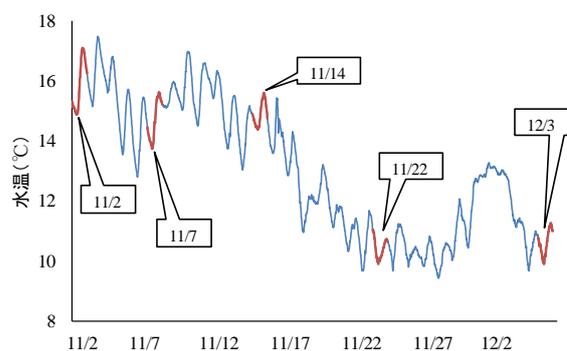


図-4 2017年の佐波川の河川水温. グラフ中の赤い部分は調査日の水温（24時間）を示す

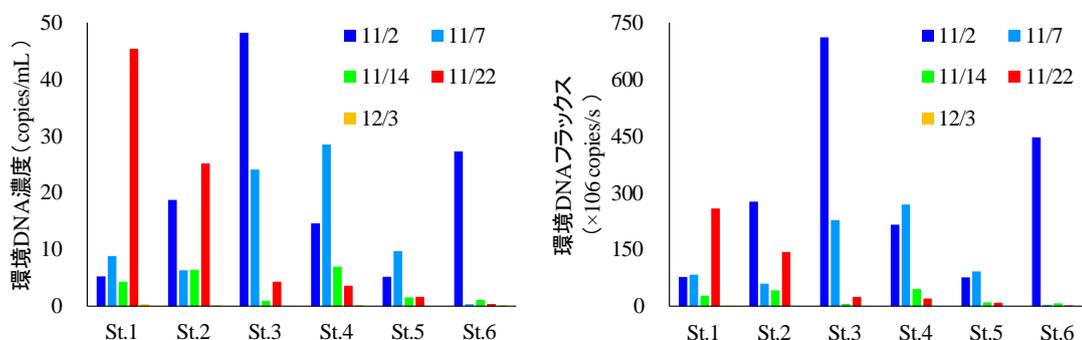


図-5 環境DNA濃度とフラックスのまとめ

(2) 月齢と産卵活性の関係性

図-6に、2018年11月6日、10日および15日の15時から22時の間の環境DNAの分析結果を示している。これら

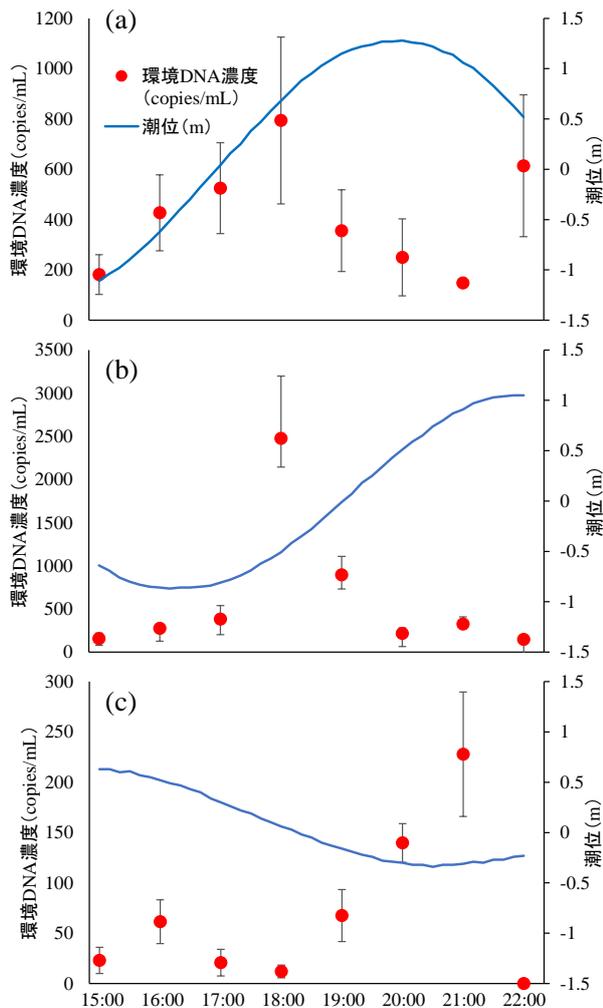


図-6 アユの環境DNA（平均±標準偏差）の時間帯による変化と潮位の関係性。なお、潮位は中関<sup>11)</sup>のものを用いている。(a) 11月6日, (b) 11月10日, (c) 11月15日

の3日間については、新橋の日平均水位がそれぞれ-0.25m, -0.21m, -0.25mとほぼ変わらなかったため、以下の結果については環境DNA濃度のみで進めていく。

調査日ごとの環境DNAの平均濃度は、11月6日が412.0 copies/mL, 11月10日が609.2 copies/mL, 11月15日が69.0 copies/mLであり、11月10日, 11月6日, 11月15日の順で高いことが明らかになった。図-7に調査日の調査時間中の水温を示している。11月6日は16.2℃～19.7℃（平均16.8℃）、11月10日は16.3℃～18.2℃（平均16.9℃）、11月15日は13.8℃～15.4℃（平均14.4℃）であり、11月6日と11月10日の水温は類似しており、11月15日の水温はやや低いという結果となった。2018年の結果と水温だけを比較すると、11月15日の環境DNA濃度が低かった理由は、水温低下により産卵期のピークが過ぎたとも考えられるが、2017年の結果も加味して検討すると、2017年は、日平均水温が10.3℃（11月22日）程度でもまだ産卵期は終わっていないと推察されたことから、必ずしも水温低下のみが原因ではない可能性が考えられる。

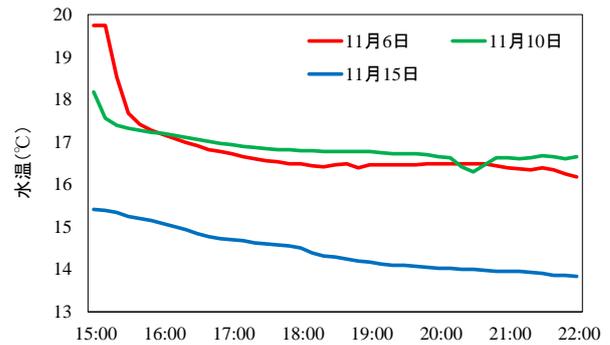


図-7 調査時間中の水温変化

次に、月齢および潮汐との関係を検討していく。環境DNA濃度が高かった11月6日は大潮、月齢28.0、11月10日は中潮、月齢2.5であり、濃度が低かった11月15日は小潮、月齢7.5であった。また、本調査をおこなったSt.2は、感潮域上端部にあたり、中関の潮位<sup>12)</sup>がT.P.1mを超えるような時間帯には水位が上昇することが調査時に明らかになった。これらの結果から、環境DNA濃度が高かった11月6日および11月10日は、夜間に調査地点の水位が上昇する日であったのに対し、11月15日は、終日潮汐の影響を受けない日であり、つまり、潮汐変動の大きい日のほうが、アユが活発に産卵している可能性が高いと考えられる。ただし、本調査は産卵盛期の3回のみ結果であるため、産卵期間中は常にそのような傾向を示すと結論付けるには情報量が少なく、また、純淡水域の産卵場においても、月齢や潮汐の影響を受けるのかどうかは現状では不明であるため、今後は、産卵期間をカバーできるような長期間・長時間のモニタリングや、純淡水域における調査が望まれる。

### (3) 産卵ピーク時間の検討

図-6に示している各調査日の環境DNA濃度の時系列変化を見ると、11月6日は、15時から右肩上がりに増加し、18時にピークをむかえ、その後21時まで減少し続けるものの、22時に再び増加した。11月10日は、11月6日同様、15時から右肩上がりに増加し、18時にピークをむかえ、11月6日とは異なり、その後はおおむね減少傾向であった。11月15日は、18時から右肩上がりに増加し、21時にピークをむかえ、22時には急減した。なお、日没時刻は、11月6日が17時17分、11月10日が17時14分、11月15日が17時10分だった。これらの3日間において、日没前に比べて日没後に環境DNA濃度が増加するという共通の傾向が見出せた。これらの結果は、アユの産卵は日没前後から活発化するという知見とも合致する<sup>11)</sup>。しかしながら、11月6日および11月10日は日没約45分後の18時がピークだったことに対し、11月15日は日没約3時間45分後の21時がピークだったという相違点がみられた。前述したとおり、11月6日および11月10日は、環境DNA濃度が高く、アユの産卵活性が高いと推察された日であ

り、11月15日は、アユの産卵活性が低いと推察された日である。つまり、産卵が盛んに行われている日には、日没1時間前後に産卵ピーク時間があり、産卵場のモニタリングをする際には、日没1時間後のサンプリングが適切であると考えられる。ただし、11月15日のように、産卵時間のピークが遅くなる場合も想定されるので、それに加えて、日没3～4時間後にもサンプリングをおこなうのが理想的である。

#### (4) 環境DNAを用いたアユの産卵場モニタリング最適手法の提案と課題

産卵盛期における昼間濃度の比較の結果、主要産卵場が産卵期間中に変化する可能性が示され（2017年佐波川の場合は下流にシフト）、月齢と産卵活性の関係性を比較した結果、比較的潮汐変動の大きい大潮や中潮の際に産卵活性が高いことが示され、さらに産卵ピーク時間を検討した結果、産卵活性が高い日には日没約45分後の18時、産卵活性の低い日には、日没約3時間45分後の21時にピークがあったことから、環境DNAを用いたアユの産卵場のモニタリングをする際には、(1) 主要産卵場だと思われる場所の上下流にも調査地点を設定する、(2) 調査日は、可能な限り中潮や大潮等の、潮位変動が大きい日に設定する、(3) 採水時間は、日中と日没1時間前後は必須で、可能な限り日没3～4時間前後にもおこなう、という手法が、本研究で明らかになった知見からは妥当であるといえる。ただし、本研究はあくまで佐波川における知見を基準にしたものであるため、地方や河川が異なる場合は必ずしも同様でない可能性があることには十分留意する必要がある、他地方、他河川でのさらなる研究が望まれる。

## 4. 結論

本研究では、環境DNAを用いたアユの産卵場モニタリングに最適な方法を検討することを目的に、アユの産卵盛期前後における複数箇所での昼間濃度の比較と、アユの産卵盛期における複数日において産卵場の下流の定点における環境DNA濃度の連続モニタリングをおこなった。

産卵盛期前後における昼間の環境DNA濃度の比較を比較した結果、産卵盛期であっても、環境DNA濃度およびフラックスの値が小さい日が存在する可能性があること、産卵期間中に主要産卵場が変化している可能性があることが示された。次に、産卵盛期における日による産卵活性の違いを比較した結果、大潮や中潮のような潮汐変動の大きい日のほうが、アユが活発に産卵している可能性が高いことが示された。

さらに、産卵盛期における主要産卵時間帯を調べた結果、アユの産卵活性の高いと推察された日には、日没約45分後の環境DNA濃度が最も高くなることが示された。

これらの結果から、環境DNAを用いたアユの産卵場モニタリングは、主要産卵場だけでなく、その上下流にも調査地点を設定し、可能な限り中潮や大潮等の潮位変動が大きい日の日中と日没1時間前後に採水をおこなうことが適当であることが明らかになった。

謝辞：本研究は国土交通省受託研究「佐波川における効率的な魚類調査に関する研究」（研究代表者：赤松良久）の一環として行った。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。ここに記して謝意を表す。

#### 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) 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。
- 5) 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。
- 6) Yamanaka H., Minamoto T., Matsuura J., Sakurai S., Tsuji S., Motozawa H., Hongo M., Sogo Y., Kakimi N., Teramura I., Sugita M., Baba M. and Kondo A. : A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant, *Limnology*, Volume 18, Issue 2, pp.233-241, 2017.
- 7) 山口皓平、赤松良久、乾隆帝、後藤益滋、河野誉仁、栗田喜久：河川における環境DNA含有物質の動態に関する基礎的研究、*水工学論文集*、Vol.74, No.5, 1-409-1-414, 2018。
- 8) 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、*水工学論文集*、Vol.73, No.4, 1-1207-1-1212, 2017。
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 松井魁：鮎。法政大学出版局、1986。
- 12) 山口県高潮防災情報システム、山口県土木建築部港湾課。  
<http://t-bousai.doboku.pref.yamaguchi.lg.jp/czpc/CitizenPcTop/>

(2019. 4. 2受付)