河川技術論文集，第26巻，2020年6月

環境DNA分析による大規模・高濁度河川におけるアユの高利用区間推定可能性の評価 −天竜川の事例−

EVALUATION OF POSSIBLE ESTIMATION OF THE SECTIONS HIGHLY USED BY AYU FISH *Plecoglossus altivelis* IN A LARGE-SCALED TURBID RIVER BASED ON ENVIRONMENTAL DNA ANALYSIS -AN EXAMPLE IN THE TENRYU RIVER-

芳賀 馨[1]・高橋 勇夫[2]・谷髙 弘記[3]・喜多村 雄一[4]
Kaoru HAGA, Isao TAKAHASHI, Hiroki YATAKA and Yuichi KITAMURA

[1]正会員　工修　電源開発㈱　茅ヶ崎研究所（〒253-0041 神奈川県茅ヶ崎市茅ヶ崎1-9-88）
[2]非会員　農博　たかはし河川生物調査事務所（〒781-5603 高知県香南市夜須町西山627）
[3]非会員　天竜川漁業協同組合（〒431-3422 静岡県浜松市天竜区米沢273-1）
[4]正会員　博（工）　電源開発㈱　茅ヶ崎研究所（〒253-0041 神奈川県茅ヶ崎市茅ヶ崎1-9-88）

For recovery of the population of Ayu fish, *Plecoglossus altivelis* in the lower Tenryu River, we have been continuing sampling of larvae and survey of food mark coverage to estimate their spawning section and feeding section. Number of days when such conventional methods are possible is small, because high turbidity often continues long and it is dangerous to enter the large river channel except when the flow is small. We surveyed environmental DNA (eDNA) of Ayu fish to evaluate whether the highly used sections can be estimated by it and obtained the following findings: 1) the distribution of eDNA concentration in river settlement period shows the similar tendency as that of food mark coverage, 2) eDNA concentration in spawning period is higher in the spawning section estimated from the yolk index of the larvae, 3) eDNA concentration in marine life period is higher in the still water section adjacent to the rivermouth. These results suggest tha eDNA analysis can be an useful substitute for the conventional methods.

Key Words : *eDNA analysis, Plecoglossus altiveris, Tenryu River, yolk index, food mark coverage*

１．はじめに

アユ *Plecoglossus altiveris altiveris* は北海道南西部から屋久島までの日本各地に生息する両側回遊魚で，生育段階を追って異なる食餌と生息場を要求する．成魚の食餌が河床付着藻類であることから太陽光がよく透過する清流を必要とし，日本の原風景と結合した清潔なイメージを持つ．これらの特性からアユは，河川環境評価の指標と地域の漁業・観光資源との両面において，非常に重要な魚種である．しかしアユの漁獲量は1990年ころから全国的に減少傾向にある[1]．

筆者らは，2012年から会議体「天竜川天然資源再生推進委員会」を組織し，天竜川の天然アユ資源の回復と河川環境の再生のための情報交換，調査，技術開発を協働で実施している[2]．アユの生息環境を改善するため，河床礫の耕耘による老化した付着藻類被膜の剥離更新，産卵床の造成等を行っている．大規模河川である天竜川に対して上記のようなインパクトをくまなく与えることは物理的に不可能であるので，生育段階毎にアユが高度に利用している区間を特定し，そこを対象として環境改善策を実施する必要がある．アユの利用区間の調査は，捕獲，目視等の個体確認によっている．天竜川では河川水の高濁度状態が慢性化していることと，河川が大きいため小規模な出水でも流速・水深が大きくなり入川が危険となることから，捕獲や目視によるアユ個体の確認が可能な日が限定される．これを補う新たな手法として，河道に沿った複数の地点で環境DNA濃度の測定を行

い，その高低によるアユの高利用区間の推定を試みた．

２．方法

(1) 対象河川区間

対象河川区間は，静岡県天竜川下流域の，河口から電源開発㈱の秋葉ダムまでの本流河道で，河道延長は流心区間追加距離で47.0kmである（**図-1**）．秋葉ダムから鹿島橋（流心区間追加距離25.2km．以下に記載する距離は全て流心区間追加距離）までの区間は両岸を山地斜面に挟まれる渓谷で，M型河道セグメントに該当する．この区間のうち電源開発㈱の船明ダム（30.1km）から横山橋（37.5km）までは同ダムの湛水範囲で，概ね止水域とみなされる．ただし36.5km付近にある放水口において，秋葉ダムからの発電放流水が注入されている．鹿島橋より下流の河道は沖積扇状地～沖積平野を流下して幅1km近い砂礫質の河川敷を形成し，1型～2型河道セグメントに該当する．5km付近（掛塚橋上流）より下流の河道は河床材料に細粒分が増え，水みちが固定化して3型河道セグメントに該当するが，流速は鹿島橋付近とあまり変わらない．最下流の橋である遠州大橋（1.8km）より下流は流速が非常に小さく，おおむね止水域とみなされる．

船明ダムには魚道が設置され，毎年アユ稚魚の遡上が確認されている．このため対象河川区間の全てが，潜在的にはアユの生息域となっている．

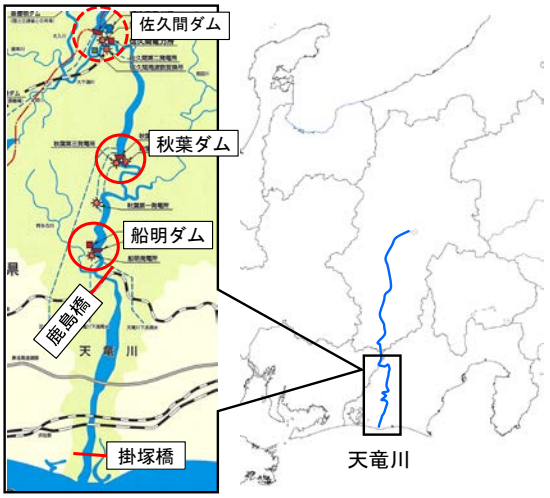

図-1 調査対象河川区間の概念図

(2) 環境DNAの分析

a) 調査地点と試料採取

2017年10月～2020年1月の8調査時期に，対象河川区間の14地点で環境DNA分析用の試料を採取した．各調査地点で汀線から流心方向に歩き，一定方向の流速がある水深30～60cmの場所で水面下約10～30cmの河川水を採取した．1時期・1地点毎の試料数は，2017年10月～2018年8月は1，2018年10月以降は2～3である．採水ボトルは容量1Lのポリエチレン製で，使用前に10倍に希釈した次亜塩素酸ナトリウム漂白剤に浸漬し，蒸留水で洗浄した．採水時にはゴム手袋を着用し，ボトルを河川水で2回共洗いした後，極力空気が残らないように水面下で水を取り入れた．また，採水位置においてプロペラ式流速計と携帯式濁度計により，6割水深の流速と表層の濁度（NTU）を測定した．試料水1000 mLに対して1 mLの10%塩化ベンザルコニウムを添加し，可能な限り気泡が残らないように栓を固く締めて5回転倒混和させた．試料水を採取後速やかにクラッシュアイスを詰めたクーラーボックスに収容し，採取当日に冷蔵宅配便で分析機関（瑞輝科学生物㈱，福岡県久留米市）に発送した．

b) 環境DNAの定量

試料水を冷蔵庫（4℃）で保存し，到着後48時間以内にフィルターGF/F 0.7μmϕ（Whatman社製）で濾過した．また超純水を同製品のフィルターで濾過し陰性対照区とした．濾過後のフィルターを−30℃に保存した．

DNA抽出キットQIAamp DNA Mini Kit（Qiagen社製）を用いて，濾過後のフィルターからDNAを抽出した．抽出の手順は既往研究[3]と同様である．

定量PCR装置Rotor-Gene Q（Qiagen社製）を用いて，定量PCR解析を行った．解析に使用したアユに特異的なプライマーは，アユのミトコンドリア・シトクロムb遺伝子の塩基配列の一部（既往研究[4]を参照して作成）である．

(3) ハミアト被度の調査

2019年9月20日に，掛塚橋上流右岸（4.3km）から秋葉ダム下流左岸（46.4km）までの8地点において，アユ成魚のハミアト被度の調査を行った．ハミアト被度とは，観察河床面積に占めるアユのハミアトの面積比率である．本研究では各調査地点において河道を横断する方向に幅0.5～1m（現場の水中の視界によって変更する）の観察範囲を設定し，潜水によってその範囲の河床を目視観察し，ハミアトの面積比を10%刻みで記録した．記録値が10%以下の場合，5%までは1%，3%，5%のいずれか近い値に整理し，5～10%は切り上げて10%とした．この作業を1地点につき8～10回繰り返し，その平均値を各調査地点のハミアト被度とした．

(4) 産卵区間の推定

天竜川漁協が毎年実施しているアユ流下仔魚の調査データに基づいて，産卵区間を推定した．浜北（約20km），寺谷（約15km），国道1号線下流（約9km）の3定点において，仔魚の主たる流下時期である[5]10，11，12月の各1日の，18，19，20，21時の各4正時に，口径0.45mの円錐形プランクトンネットを用いて，流下中のアユ仔魚を採集した．ネットの濾水量は網口に付けた濾水計で測定した．採集された仔魚を5%ホルマリンで固

表-1 環境DNA濃度と河川水濁度の測定結果

調査地点（*は図-2で推定された主産卵区間に含まれる地点）	流心区間追加距離(km)	河川定着期				産卵・孵化流下期								海域生活期			
		18/8/7		19/9/19-20		17/10/13		18/10/29		18/11/20		19/11/12-13		19/1/30		20/1/16	
		濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)	濃度(copies/mL)	濁度(NTU)
遠州大橋下流左岸	1.3			6.6	16							11	30			1.2	13
*掛塚橋上流左岸	3.7							41	21	68	47			0.20	7		
*掛塚橋上流右岸	4.3			32	3							11	29			0.13	6
*新幹線上流右岸	6.9					28	4.5	8.9	40	49	36						
*国道1号線下流左岸	9.2			24	6			7.7	16	51	31	17	27				
*寺谷左岸	16.0			25	3							8.1	37			0.58	7
飛龍大橋上流右岸	24.3			6.7	7							8.7	37				
塩見渡橋下流左岸	28.5			17	3			4.2	31	10	62						
横山橋上流右岸	37.5															0.67	0
気田川合流点下流右岸	39.8	31	0.1			68	6.6	7.7	3	140	1						
気田川合流点上流左岸	41.2					6	6.6										
雲名橋上流左岸	42.1			6.8	5							0.39	27				
鮎釣右岸	44.9			6.4	4												
秋葉ダム下流左岸	46.4			1.8	4							0.86	37			0.19	15

定後，総個体数を計数するとともに各個体の卵黄指数を目視により判別した．卵黄指数とは孵化直後のアユ仔魚が栄養源として吸収する卵黄の残量を日数に換算した整数値で，孵化直後の4から枯渇状態の0までの5段階で図示され[6]，孵化後の経過日数の指標となる．これらのデータから，調査日・正時別に，流水中の個体密度（個体数/m^3）と卵黄指数の構成比を求めた．また国土交通省が掛塚橋上流（約5km）で同様の流下仔魚調査を行っているので，そのデータも合わせて分析した．分析の基本的な考え方は以下の3点である．

① 個体密度の大/小は，当該月日・地点で採集された仔魚が発生した産卵場の規模の大/小を反映する．
② 実験[7]で確認されているアユの孵化時刻のピーク（18～19時）と最大の個体密度が得られた正時との時間差の大/小は，当該月日・地点で採集された仔魚が発生した産卵場から当該地点までの距離の大/小を反映する．
③ 高い卵黄指数（3～4）の個体の構成比の大/小は，当該月日・地点で採集された仔魚が発生した産卵場から当該地点までの距離の小/大を反映する．

2006年から2018年までの各年のデータの分析に基づいて推定された産卵区間（産卵場が存在する可能性がある区間）と主産卵区間（大規模な産卵場が存在する可能性がある区間）を，**図-2**に示す．主産卵区間が表示されていない年は，大規模な産卵場が形成されなかったと推定された年である．産卵区間は，船明ダム直下流（約29km）から掛塚橋上流（約5km）までで，過去13年間変化していない．主産卵区間は，近年縮小かつ下流へ移動する傾向にあり，2013年以降は寺谷（約15km）から掛塚橋上流（約5km）までの範囲に出現している．

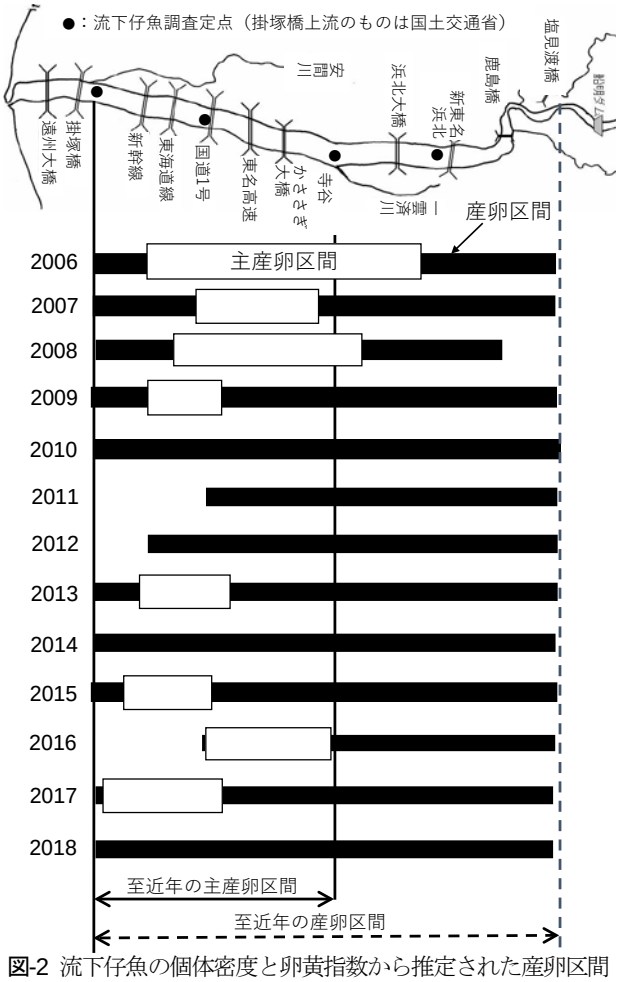

図-2 流下仔魚の個体密度と卵黄指数から推定された産卵区間

3．結果と考察

(1) 河川水の濁度と環境DNA濃度の関係

表-1に，定量された環境DNA濃度（試料数が2～3の地点ではそれらの平均値）と，その試料採取箇所で測定された濁度を示す．これらの数値を散布図に表すと**図-3**が得られる．環境DNA濃度と河川水の濁度のプロットは無秩序に分散し，両者間に相関関係は認められない．これにより，環境DNA濃度は試料採取時の河川水の濁度に影響されないことが示唆された．

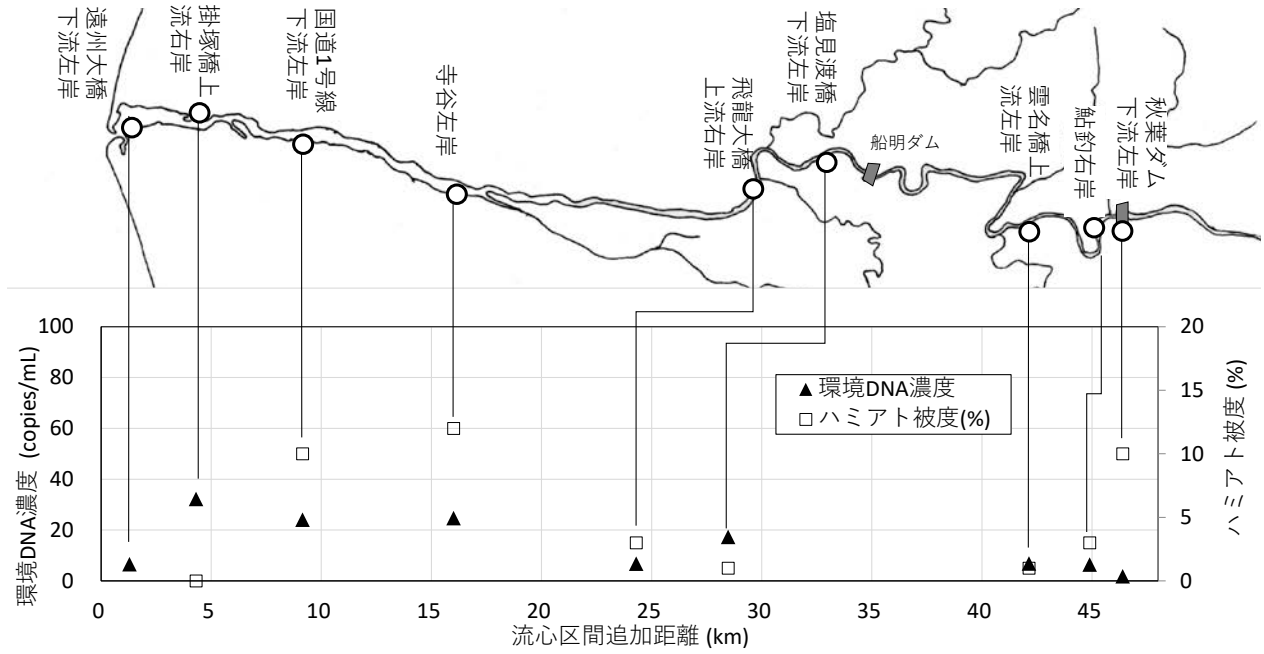

図-4 環境DNA濃度とハミアト被度の比較結果（2019年9月20日）

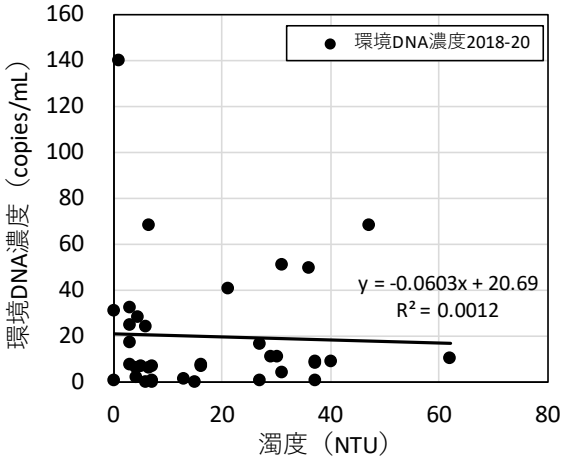

図-3 環境DNA濃度と河川水濁度の散布図

(2) ハミアト被度と環境DNA濃度の関係

2019年9月20日に測定されたハミアト被度と，ハミアト被度調査と同時・同所で採取された水試料から定量された環境DNA濃度の空間分布を，流心区間追加距離を横軸とした散布図に表し，比較した（**図-4**）．なお最下流の遠州大橋下流左岸はハミアト被度の調査地点に含まれていなく，環境DNAの濃度のみが得られている．

ハミアト被度は下流寄りの10～15km区間で相対的に高く（10～12%），5km付近と25km付近より上流では低く（0～3%）なっていた．環境DNA濃度も10～15kmで相対的に高く（24～25 copies/mL），25km付近より上流では低く（1.8～6.8 copies/mL）なっているので，全体的には両者の高低は類似した傾向を示している．

両者の高低が類似していないのは秋葉ダム下流左岸と掛塚橋上流右岸の2地点で，前者では環境DNA濃度が1.8 copies/mLと低いにもかかわらずハミアト被度が10%と高い．後者では環境DNA濃度が最も高い（32 copies/mL）にもかかわらずハミアト被度は0%となっている．この2地点の傾向が他と異なるのは以下のように解釈できる．対象河川区間では河川水の高濁度状態が慢性化しており，河床もシルト・粘土等の濁水粒子（微細な鉱物粒子）に覆われていることが多い[8]．アユは濁水粒子交じりの付着藻類を摂食しているが，濁水粒子は付着藻類に比べて剥離しにくいので，時間の経過したハミアトが消えずに残り，被度として計上された可能性がある．一方9月20日という調査時期は，対象河川区間におけるアユの夏季生活期の最末期で，産卵・孵化流下期へ移行する時期であった．このためアユ成魚のかなりの部分が，至近年の主産卵区間の下流端である5km付近まで降下していた可能性があり，ハミアトが観察されない一方で環境DNAは検出された可能性がある．また上記の調査時期は仔魚の流下が始まるには早すぎるので，河口に近い止水域である遠州大橋下流左岸の環境DNA濃度が低かったことも首肯できる．

(3) 推定利用区間と環境DNA濃度の関係

a) 産卵・孵化流下期

2017～2019年の10～11月（産卵・孵化流下期）に対象河川区間の11地点で採取された試料から定量された環境DNA濃度を，流心区間追加距離を横軸とした散布図に表し，流下仔魚の個体密度と卵黄指数から推定された主産卵区間と比較した（**図-5**）．**図-5**の上段は，対象河川区間の環境の大分類に，図-2に示した至近年の主産卵区間を重ね書きした模式図である．**図-5**の中段には環境DNAの濃度を示し，あわせて2019年11月12～13日に測定された試料採取箇所の流速値（記号＊）とそれに基づ

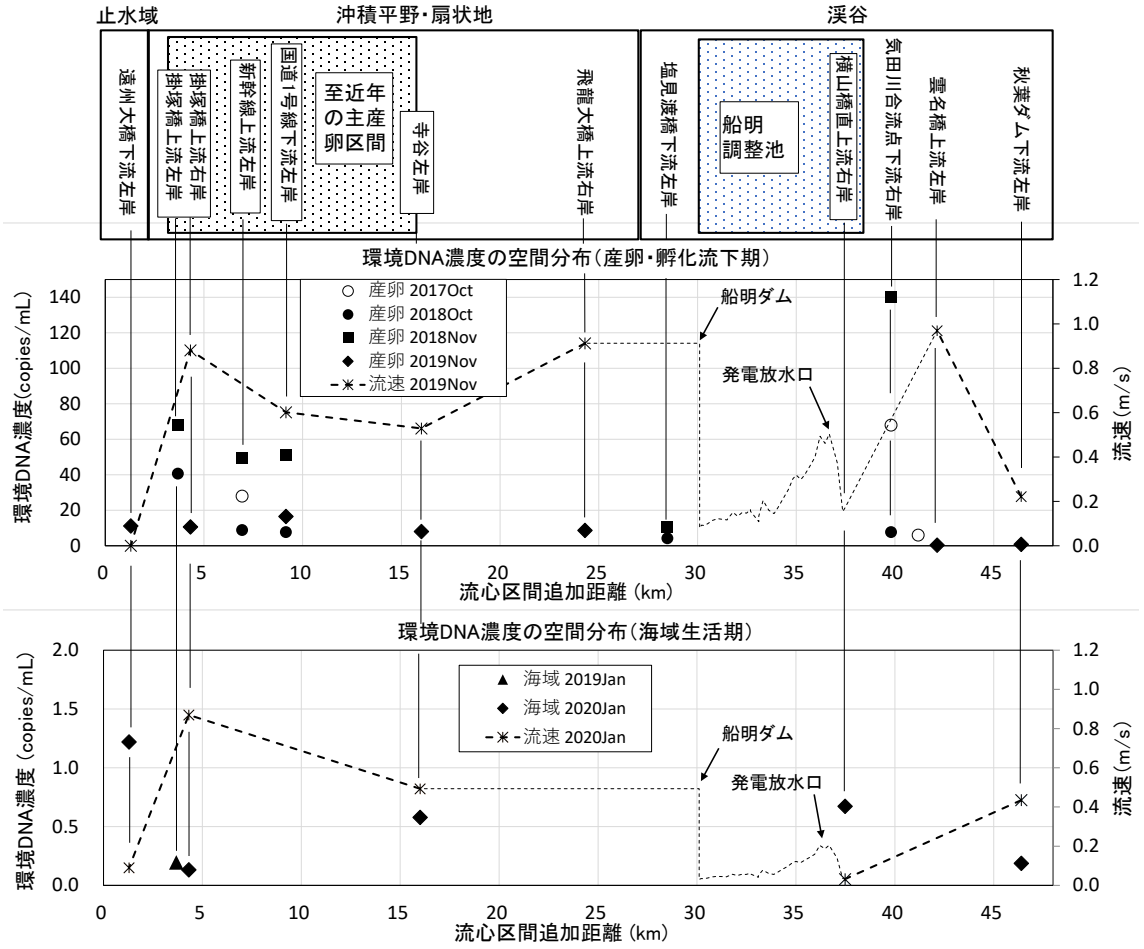

図-5 環境DNA濃度と推定主産卵区間および流速との比較結果

いて推定された流速分布を第二軸に示す．流速を測定した理由は，止水域と流水域で同日に試料を採取し，環境DNA濃度が異なるか否かを確認するためである．流速分布のうち船明調整池内の部分（線を細くして実測部分と区別）は，船明ダムの水位と秋葉・船明ダムの発電使用水量から推定された断面平均流速である．

図-2に示した至近年の主産卵区間に含まれる，掛塚橋上流左岸から寺谷左岸までの5地点のうち3地点では，相対的に高い環境DNA濃度（20copies/mL以上）が1回以上検出されている．一方，主産卵区間に含まれない地点（寺谷左岸より上流の8地点および最下流の遠州大橋下流左岸）の環境DNA濃度は，ほとんど10 copies/mL以下となっている．全体としてみると，環境DNA濃度が相対的に高い区間と主産卵区間は重なる傾向にある．例外は気田川合流点下流右岸（39.8km）で，2017年10月に68 copies/mL，2018年11月に140 copies/mLという高い値が検出され，後者は本研究の全試料中の最高値である．気田川合流点は船明調整池区間の上流端に近く，流速が急激に低下する区間に含まれる．このため，同調整池で流下を遮断された個体が滞留していたと解釈できる．実際に筆者らは，気田川合流点から横山橋にかけての区間で，秋季に産卵するアユを観察したことがある．

b）海域生活期

図-5の下段に，2019～2020年の海域生活期（1月）に対象河川区間の6地点で採取された試料から定量された環境DNA濃度の空間分布を示す．第二軸に図示した流速分布は，2020年1月16日に測定された試料採取箇所の流速値に基づいて，a)と同様に推定された．

海域生活期に検出された環境DNA濃度は，産卵・孵化流下期に比べて全般に1桁小さくなっており，至近年の主産卵区間（5～15km）に対応する3地点では特に差が大きい．山口県佐波川では既往研究[9]により，アユの産卵期の終息とともに産卵区間の環境DNAの濃度が減少する状況が確認されているが，大規模な河川である天竜川においても，環境DNA分析によって同様の挙動が検出できることがわかった．

海域生活期の数値同士を比較すると，産卵・孵化流下期に相対的に高い環境DNA濃度が検出された5km付近の濃度が0.2 copies/mL以下と小さくなっているのに対し，最下流の遠州大橋下流左岸では1.2 copies/mLと，海域生活期の数値では最大となっている．同様に，秋葉ダム下

流左岸の濃度が低いのに対し，横山橋上流右岸の濃度は相対的に高くなっている．遠州大橋下流左岸と横山橋上流右岸は，いずれも河川流が海および調整池という止水域に達する直前の地点である．上流区間から流下した仔魚の一部が両地点付近で越冬していると解釈できる．

なお，寺谷左岸（15km）で相対的に高い値が検出されている理由が従来の生態的知見から説明できない．前記したとおり海域生活期の環境DNA濃度は絶対的に小さく，ほとんどの地点で1 copies/mL未満となっている．このため試料採取時のばらつきまたは分析時の誤差の影響が相対的に大きくなった可能性が考えられるが，現時点では不明である．

４．結論

天竜川下流域の約47kmの区間において，2019年度の河川定着期に9地点で，2017年度～2019年度の産卵・孵化流下期に11地点で，2018年度～2019年度の海域生活期に6地点で，河川水を採取し，定量PCR法によってアユの環境DNA濃度を測定した．その結果，河川定着期の測定値の高低は同日に調査されたハミアト被度の大小と，産卵・孵化流下期の測定値の高低は2006年～2018年までの13年間に実施された流下仔魚の調査結果から推定された主産卵区間と，類似した傾向を示した．海域生活期には，止水域の直上流の地点の環境DNA濃度が流速のある地点のそれより高い傾向があり，仔魚の存在を反映していることが示唆された．これらのことから，環境DNA濃度の高低は，河川の中でのアユの利用度の相対的な高低を反映していると考えられる．

一方，環境DNA試料採取と同時同所で測定された濁度との比較から，環境DNA濃度は濁度と関係を持たないことが示唆された．

以上から，大規模な河川において濁水や出水のためにアユの個体確認が困難である場合にも，環境DNA分析が，アユの高利用域を推定する代替手段として有用であることが示唆された．

謝辞：アユの産卵区間の推定に際して，国土交通省が実施した流下仔魚調査のデータを使用させていただいた．データの使用をお許しくださった同省浜松河川国道事務所の関係各位に厚くお礼申しあげる．

参考文献

1) 農林水産省: 内水面漁業・養殖業魚種別生産量累年統計 全国（昭和31年～平成27年），農林水産省, 2017.
2) 喜多村雄一・村上哲生: 天竜川における総合的な河川環境マネジメント, 大ダム, No. 229, pp. 117-122, 2014.
3) 皆川朋子・秋山秀樹・狭間俊介・児玉紗友里: 環境DNA分析による瀬淵スケールを対象としたアユの生息場・産卵場評価に関する基礎研究, 土木学会論文集B1（水工学）, Vol. 74, No. 5, pp. I_427-I_432, 2018.
4) 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.
5) 鈴木邦弘・鈴木勇己・谷髙弘記・井口明: 興津川と天竜川におけるアユの産卵生態からみた現行の禁漁措置の妥当性, 静岡水技研研報, No. 46, pp.85-91.
6) 塚本勝巳: 長良川・木曾川・利根川を流下する仔アユの日齢, Nippon Suisan Gakkaishi, Vol.57, No. 11, pp.2013-2022, 1991.
7) 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, pp. 201-207, 1999.
8) 村上哲生: ダム堆砂排出が河川の一次生産者に及ぼす影響, 第11期プロ・ナトゥーラ・ファンド助成成果報告書, pp. 17-20.
9) 乾隆帝・河野誉仁・赤松良久・後藤益滋・山口皓平: 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～, 河川技術論文集, Vol. 25, pp. 429-434.

（2020. 4. 2受付）