

環境DNA分析を用いた高知県四万十川と島根県 高津川のアユの降下・産卵期の比較 ～河川水温との関係性を中心に～

A COMPARISON OF *Plecoglossus altivelis* SPAWNING SEASON IN SHIMANTO RIVER AND TAKATSU RIVER USING ENVIRONMENTAL DNA
—THE EFFECT OF WATER TEMPERATURE—

乾 隆帝¹・赤松 良久²・岡田 将治³・河野 誉仁⁴・中尾 遼平⁵
Ryutei INUI, Yoshihisa AKAMATSU, Shoji OKADA, Takanori KONO and Ryohei NAKAO

¹正会員 農博 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)

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

³正会員 工博 高知工業高等専門学校准教授 ソーシャルデザイン工学科
(〒783-8508 高知県南国市物部乙200-1)

⁴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)

⁵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)

The *Plecoglossus altivelis* population, the most important target fishery species in rivers, is in decline. Previous studies have shown that environmental DNA (eDNA) can be used to monitor the *P. altivelis* spawning grounds. In this study, we sampled the eDNA in Shimanto River and Takatsu River to identify differences in the spawning season and spawning time, the relationship between water temperature and spawning season, and changes to the spawning ground during the spawning season. Our results showed that the spawning season is longer in Shimanto River than in Takatsu River because of the water temperature in December. Furthermore, the main spawning grounds change during the spawning season in both rivers, and the spawning times are different.

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

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1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が、近年、アユの資源量減少の要因として降下・産卵期に利用する環境の悪化が指摘されている。例えば、産卵には河床環境の悪化³⁾が、仔稚魚の生残率には海水温が影響を及ぼすこと²⁾が示唆されている。よって、アユの資源量には、産卵環境だけでなく、海域に仔魚が流下する時期、つまり産卵期が資源量に影響を与える可能性が高いと考えられる。

アユの産卵期に影響を及ぼす要因としては、河川水温や、出水³⁾の可能性が示唆されているが、研究例が少なく詳細は明らかになっていない。これまで、アユの降下産卵期を対象としたモニタリングには環境DNA分析が有効であることが示されており、実際に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濃度が高くなることや⁴⁾、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⁵⁾、産卵盛期においては日没約45分後の環境DNA濃度が最も高くなること⁶⁾、実際に卵が確認された箇所において夜間の環境DNA濃度が高くなること⁷⁾が示されている。そこで本研究では、環境DNAを用い、高知県の太平洋に流入する四万十川と、島根県の日本海に流入する高津川のアユの産卵場として知られている下流域の瀬において環境モニタリングをおこなうことによ

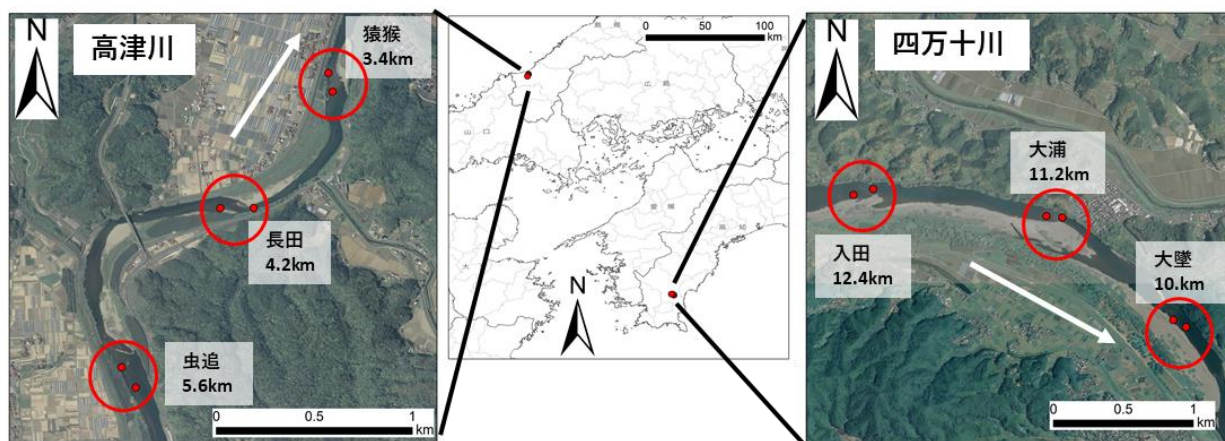


図-1 四万十川と高津川の調査地点。地点名の下は河口からの距離。

り両河川における降下・産卵期を明らかにし、さらに、連続的に計測した河川水温との関係性を調べることで、アユの降下・産卵期と河川水温の関係性を明らかにすることを試みた。

2. 方法

(1) 対象河川

四万十川は、高知県西部に位置し、太平洋に注ぐ、幹線流路延長196km、流域面積2186km²の一級河川である。上流部は急峻な山地から南に流れ、窪川盆地を経たのち流れを西に向けて再び山地に囲まれた中流部に至る。中流部では勾配が緩やかになり、下流部においては1/1,200～1/2,200程度とさらに緩やかになるという特徴を持っている河川である。高津川は、島根県西部の日本海側に位置し、日本海に注ぐ、幹線流路延長81km、流域面積1090km²の一級河川である。形状は南北44km東西40kmの羽状をなし、流域の大半を山地が占める河川である。

両河川ともに、下流域にアユの遡上や降下を妨げるような横断構造物がないことから、アユ本来に近い降下動態を明らかにできる可能性が高いと考え、調査河川として選定した。なお、高津川では、本研究同様に環境DNAを用いた河野ら⁴⁾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、11月末になると産卵期が終了している可能性が高いことが示されている。

(2) 調査方法

a) 環境DNAのサンプリング

四万十川において2018年11月から2019年3月にかけて計10回、高津川において2018年11月から2019年2月にかけて計9回、両河川ともに主要産卵場であることが知られている3つの瀬（四万十川：大壁地点、大浦地点、入

田地点、高津川：猿猴地点、長田地点、虫追地点）において採水した（図-1）。本研究では、（1）平均濃度の季節変化、（2）産卵期と河川水温の関係、（3）産卵期における産卵場の変化、および（4）産卵時間帯の4つの事項を明らかにすることを目的にしたため、（1）および（2）については四万十川では全10回、高津川では全9回、日中（日没4時間前から1時間前の間）、瀬の下流における採水をおこない、（3）については四万十川で4回、高津川で3回、日中、瀬の上・下流側で採水をおこない、（4）については四万十川で11月7日、高津川で11月8日に、日中および日没後（日没3時間後から4時間後の間）におこなった。河川水温は、両河川ともに赤松ら⁸⁾に従い、河床付近に設置型水温ロガー（HOBO WaterTemp Pro V2）を設置し15分間隔で測定した。採水はすべて、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⁹⁾、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、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。

b) 環境DNA分析

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 μm; GE Healthcare）で濾過し、アルミホイルで包んで-20℃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.¹⁰⁾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、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

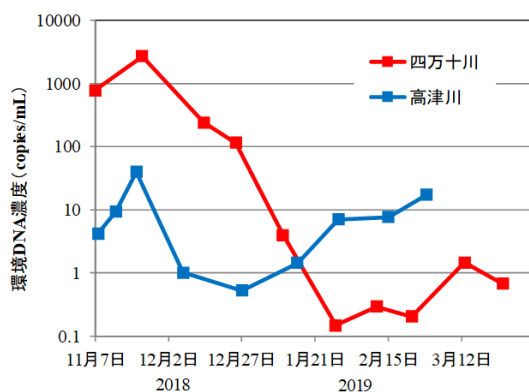


図-2 四万十川と高津川におけるアユの環境DNA濃度の
平均値の季節変化

異的なプライマーおよびTaqMan蛍光プローブについては、Yamanaka&Minamoto¹¹⁾と同様のものを使用した。また、標準試料として、PCRごとにアユの人工合成DNA¹¹⁾、60000、6000、600および60 copiesを測定し、それらの結果から得られた検量線をもとにサンプルの定量化をおこなった。

3. 結果

(1) 四万十川と高津川における平均濃度の季節変化

調査期間中の両河川における3つの瀬の下流側において日中に採水したアユの環境DNA濃度の平均値の推移を図-2に示している。四万十川は、11月23日にピーク（2679 copies/mL）を示し、その後減少していくものの、12月25日までは比較的高い濃度（115 copies/mL）を示し、その後濃度が急減し、1月21日から再度増加傾向を示したが、1月以降は比較的低濃度であった。高津川は、11月21日にピーク（40 copies/mL）を示し、12月7日には濃度が急減し、1月15日から再び上昇した。

本研究における調査地点は産卵場であることから、高濃度を検出した期間が両河川における産卵期であると推察でき、四万十川における産卵期は12月後半まで、高津川における産卵期は11月後半までであり、産卵期の終了に約1ヶ月の差がある可能性が高いことが明らかになった。本研究では産卵の開始時期を対象にしていなかったため、産卵開始時期の相違を明らかにすることは今後の課題である。また、両河川ともに再度濃度が上昇した理由は、未成魚の遡上か、成魚の生残個体の影響かは現状では不明である。

また、両河川における産卵期中の全地点の平均濃度は、高津川（18 copies/mL）に比べて四万十川（952 copies/mL）が高かったことから、本研究期間である2018年度においては、高津川に比べて四万十川のアユの資源量（特に産卵個体）は多かったと推察される。

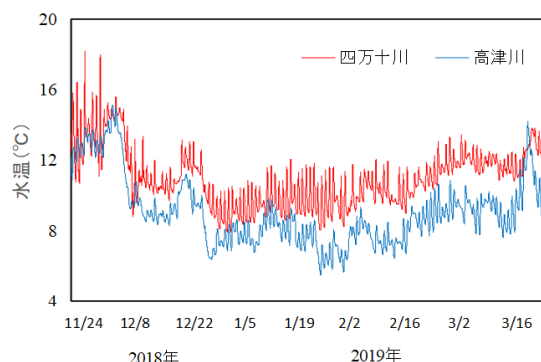


図-3 四万十川と高津川における河川水温の季節変化

表-1 四万十川と高津川における7日ごとの河川水温

	平均水温(°C)			最低水温(°C)		
	四万十川	高津川	差	四万十川	高津川	差
11月24日～	13.4	12.8	0.6	10.6	10.9	-0.2
12月1日～	14.2	13.5	0.7	11.1	11.1	-0.1
12月8日～	11.1	9.5	1.6	8.8	8.5	0.3
12月15日～	10.6	9.0	1.6	9.7	8.3	1.4
12月22日～	11.6	9.8	1.7	9.8	7.2	2.6
12月29日～	9.1	7.3	1.9	7.9	6.4	1.5
1月5日～	9.3	7.7	1.6	8.4	6.7	1.6
1月12日～	9.7	8.5	1.2	8.6	7.4	1.2
1月19日～	9.9	7.8	2.0	8.6	6.8	1.9
1月26日～	9.5	6.6	2.9	8.0	5.5	2.5
2月2日～	10.0	7.7	2.2	8.2	5.6	2.6
2月9日～	10.2	7.3	2.9	9.4	6.4	3.0
2月16日～	10.3	8.2	2.2	9.0	6.7	2.3
2月23日～	11.4	9.1	2.3	10.2	7.7	2.5
3月2日～	12.0	9.3	2.7	11.2	7.8	3.3
3月9日～	11.8	9.2	2.6	10.8	7.6	3.2
3月16日～	12.0	10.3	1.7	10.8	7.8	2.9
3月23日～	13.0	10.3	2.7	11.9	8.8	3.1

(2) 四万十川と高津川における水温と産卵期の関係

調査期間における四万十川および高津川の河川水温の変化を図-3に、河川水温の7日ごとの平均値と最低値を集計したものを表-1に示している。図-3から、全体を通して四万十川のほうが高い傾向にあることが見て取れる。7日ごとの平均値と最低値を比較してみると、11月24日からの7日間、12月1日からの7日間の最低水温以外は全て四万十川が高いことが明らかになった。また、期間平均水温に着目すると、四万十川が10℃を下回っていたのが12月29日からの35日間だったことに對し、高津川は12月8日から3月15日までの70日間だった。

これらの結果と環境DNAで明らかになった両河川における産卵期の結果を比較すると、高津川では産卵期が終了しているにもかかわらず、四万十川では産卵期であったと推察される12月の平均水温が、四万十川ではほとんどの期間で10℃を上回っていたのに対して、高津川では12月初旬の7日のみだったという違いがあったことから、アユの産卵期は、成熟した親魚が存在していれば、平均水温が10℃を上回る期間においては続くのではないかと考えられる。当然、アユの成長・成熟には河川水温だけでなく海水温や他の要因も関わってくるため、どの河川においても同様の傾向が示されるとは限らないが、本研究の結果から、産卵期に比較的高水温の河川においては、産卵期が長く続く可能性が示されたとと言える。他の河川

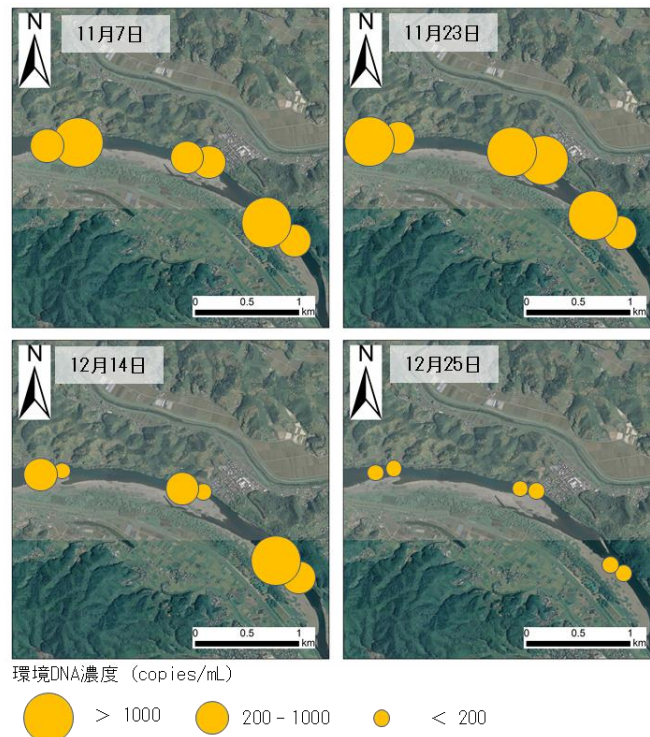


図-4 四万十川におけるアユの環境DNA濃度の地点間比較

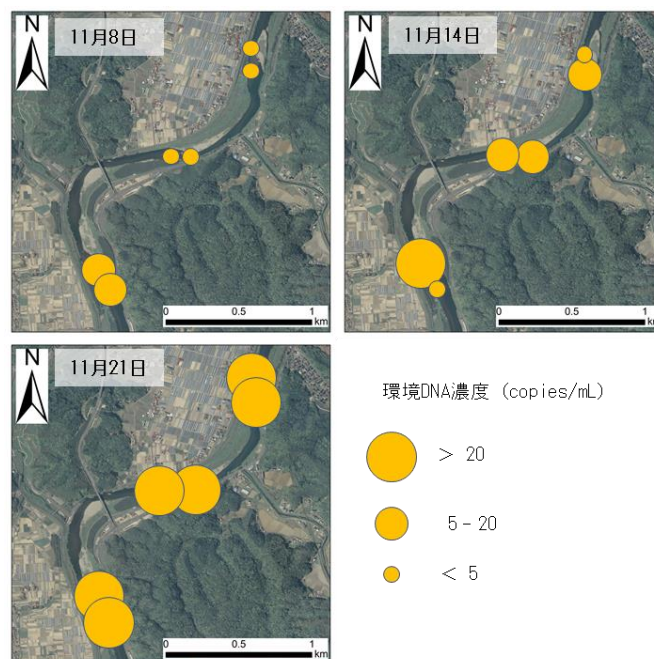


図-5 高津川におけるアユの環境DNA濃度の地点間比較

においても情報の蓄積が望まれる。

(3) 産卵期における産卵場の変化

四万十川において産卵期だと推定された11月から12月にかけての各地点の環境DNA濃度を図-4に、高津川において産卵期だと推定された11月における各地点の環境DNA濃度を図-5に示している。なお、これらのデータは両河川ともに、3つの瀬の上・下流側において日中に採

水したサンプルの分析結果である。

四万十川においては、11月7日は、最下流の大墜地点の上流側、最上流の入田地点の下流側で1000 copies/mLを超える高い値を示した。平均濃度が最も高かった11月23日は、4地点以上で1000 copies/mLを超える高い値を示し、特に中流に位置する大浦地点の下流で顕著に高い値 (6391 copies/mL) を示した。12月14日は、11月23日に比べて全体的に濃度は減少したが、最下流の大墜地点

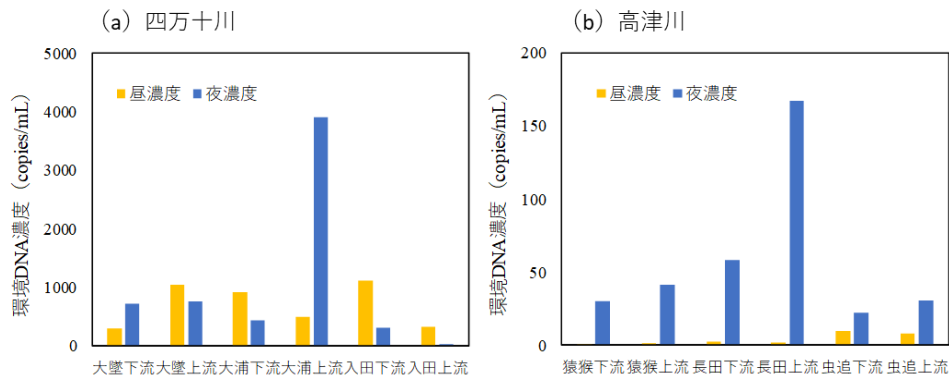


図-6 環境DNA濃度の昼夜間比較. 調査日は、四万十川は2018年11月7日、高津川は2018年11月8日.

の上流側で1000 copies/mLを超える高い値を示した。12月25日は、12月14日に比べて全体的に濃度が減少した。これらの結果から、四万十川では、瀬の下流側のみの平均濃度で見たとき同様11月23日が産卵期のピークであり、12月25日になると産卵期が終盤を迎えること、そして、産卵期盛期には3つの瀬が偏りなく産卵に利用されている可能性が高いものの、産卵期後期である12月14日は、下流に位置する大壁地点が主要産卵場になっている可能性が示唆された。

高津川においては、11月8日は、産卵期の中では全体的に濃度が低い傾向にあったが、その中で最上流に位置する虫追地点の上・下流が比較的高い値を示した。11月14日になると、濃度は全体的に増加し、最上流に位置する虫追地点の下流側で20 copies/mLを超える高い値を示した。11月23日になると、さらに全体的に濃度が増加し、全ての地点で20 copies/mLを超える高い値を示した。それらの中で、中流に位置する長田地点の上流側が最も高い値（124 copies/mL）を示した。これらの結果から高津川では11月8日には上流側に偏っていた産卵場が、11月21日になると下流域まで拡大した可能性が示唆された。

本研究では、両河川ともに、産卵期中に主要産卵場が変化する可能性が示唆された。今後は、本研究では言及できなかった産卵期前半（9月～10月）の情報を加えたうえで、産卵期全体における産卵場の変遷についての知見を蓄積していくことが課題である。

(4) 産卵時間帯の検討

図-6に、両河川の3つの瀬の上・下流、計6地点において日中および日没3時間後に採水したサンプルから得られた環境DNA濃度を示している。四万十川においては、夜間の濃度が大壁地点下流側で2.5倍、大浦地点上流側で8.0倍になったものの、他の4地点においては日中の濃度のほうが高かった。これらの結果から、四万十川は、日没前に既に産卵が始まっていて、多くの地点で日没3時間後には産卵時間帯のピークを過ぎていた可能性が高いことが示唆された。実際、調査者がアユの産卵行動を

目撃したのも日中が中心であった。

一方、高津川では、全ての地点において夜間の濃度が上昇し、特に長田地点の上流では113.9倍、猿猴地点の下流では42.9倍、猿猴地点の上流では36.2倍と顕著な増加を示していた。これらの結果から、高津川では日中には殆ど産卵せず、日没後に産卵時間帯のピークが来る可能性が高いことが示唆された。実際、調査者がアユの産卵行動を目撃したのは日没後のみであった。

一般的には、アユの産卵は夕刻から日没後に活発になることが知られており¹²⁾、実際、中国地方の佐波川での環境DNAを用いたモニタリングでも日没後にピークを迎えることが示されている⁶⁾。また、高知県奈半利川の人工産卵場の下流で環境DNAのモニタリングをした場合も、夜間に濃度が増加していた⁵⁾ことから、四万十川で昼間から産卵が始まっていた理由が地理的な違いである可能性は低いと考えられる。本研究では昼夜間比較は1回のみであったため、四万十川においてこの傾向が常に生じているのか、あるいは2018年11月7日だけの傾向であったのかは現状では不明であるが、四万十川における産卵期の昼間の環境DNAが常に高濃度であったことから、他の日も同様の傾向を示していた可能性が十分に考えられる。また、四万十川は、環境DNA濃度の高さからも、アユの資源量の多い河川であることがわかるため、限られた産卵場を多くの個体が利用するために、産卵時間が他の河川より長くなっている可能性も考えられる。今後は、四万十川においても、佐波川での先行研究⁶⁾同様に、長時間におけるサンプリングをおこなうことにより、産卵時間を明らかにすることが課題であるといえる。

4. 結論

本研究では、四万十川と高津川を対象に、アユの産卵期以降の産卵場において、環境DNA分析を用いることにより、(1)四万十川と高津川における平均濃度の季節変

化、(2) 四万十川と高津川における水温と産卵期の関係、(3) 産卵期における産卵場の変化、および(4) 産卵時間帯を明らかにすることを試みた。

(1) の結果、四万十川における産卵期は12月後半まで、高津川における産卵期は11月後半までであることが明らかになったと同時に、高津川に比べて四万十川のアユの資源量（特に産卵個体）が多いことが明らかになった。(2) の結果、調査期間全体を通して四万十川のほうが水温が高い傾向にあることが明らかになり、特に高津川では産卵期が終了しているにもかかわらず、四万十川では産卵期であったと推察される12月の平均水温が、四万十川ではほとんどの期間で10℃を上回っていたのに対して、高津川では12月初旬の7日のみだったという違いがみられた。(3) の結果、四万十川では、産卵期盛期には3つの瀬が偏りなく産卵に利用されている可能性が高いものの、産卵期後期である12月14日は、下流に位置する大墜地点が主要産卵場である可能性が高いこと、高津川では11月8日は最上流に位置する虫追地点が主要産卵場であるが、11月14日には3つの瀬が利用され、11月23日は中流に位置する長田地点が主要産卵場である可能性が高いことが示唆された。(4) の結果、四万十川では多くの地点が日中の濃度のほうが高かった一方、高津川では、全ての地点において日没後の環境DNA濃度が上昇することから、河川による産卵時間帯の違いが明らかになった。これらの結果から、河川水温によってアユの降下・産卵動態が大きく異なること、アユの資源量の多少にかかわらず、産卵期中に主要産卵場が変化する可能性があること、そして資源量の違いによって産卵時間帯が異なる可能性があることが示された。

本研究の結果のうち、特に河川水温に着目した場合、今後の気候変動による河川水温の変化や、ダムや堰による人為的環境変化に伴う水温変化がアユの産卵期を変化させる可能性があることが示唆されたといえる。アユは両側回遊魚であるため、降下時の海水温が適切な状態で降下しないと生残率が悪くなるため²⁾、海水温の変動とともに、河川水温の変動を随時モニタリングしていく必要があると言える。場合によっては、ダム等を用いた水温調整によって産卵期をコントロールすることが、資源保全に有効になる可能性も十分有り得ると言える。また、産卵期のアユのモニタリングには環境DNAが有効であることは既往の知見通り^{4),5),6),7)}であったが、四万十川のように産卵場に対してアユ資源量が多いと思われる河川においては、日中から産卵が開始されている可能性も高く、今後の環境DNAを用いたアユの産卵期・産卵場のモニタリングをおこなううえで、単純に日中と日没後と比較するだけではなく、その河川の産卵時間帯に応じた調査時間の設定も必要であるといえる。今後は、全河川に適応可能な環境DNAを用いたアユの産卵期・産卵場の調査基準の設計を目標に、他の河川においても知見を

集積していきたいと考えている。

謝辞：本研究は国土交通省中国地方整備局浜田河川国道事務所受託研究「高津川における河床掘削が河川環境に与える影響の研究」（研究代表者：赤松良久）の一環として行った。また、四国地方整備局中村河川国道事務所には四万十川のアユの産卵状況に関する調査結果を、中国地方整備局には河川環境に関する貴重なデータを提供いただいた。記して謝意を表する。

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) 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，第25巻，pp.429-434，2019.
- 7) 吉田圭介，乾隆帝，宇田川涼平，前野詩朗，赤松良久，兒子真也，高橋幸生，永田貴美久：環境DNA分析と物理環境調査による旭川下流部におけるアユの産卵可能性の検討，土木学会論文集B1(水工学)，Vol.75, No.2, I_529-I_534，2019.
- 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, I_1207-I_1212，2017.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 松井魁：鮎，法政大学出版社，1986.

(2020. 4. 2受付)