

環境DNAを用いたダクトイル鑄鉄かご工法 「鑄田籠」の魚類・甲殻類の生息場としての 機能評価

FUNCTIONAL EVALUATION OF DUCTILE IRON NET METHOD “CHUTARO”
AS HABITATS OF FISHES AND DECAPODS USING ENVIRONMENTAL DNA
METHODS

松村 憲吾¹・赤松 良久²・中尾 遼平³
Kengo MATSUMURA, Yoshihisa AKAMATSU and Ryohei NAKAO

¹非会員 アボンコーポレーション株式会社 (〒747-0012 山口県防府市牟礼今宿1-18-14)

²正会員 博 (工) 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 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)

Recent years, “nature-oriented river works” taking riverine landscape and biota into consideration have been conducted on river management. One of the techniques in the nature-oriented river works is “ductile iron net method”. This study has evaluated the function of the ductile iron net method named “Chutaro” for habitats of fishes and decapods, using environmental DNA (eDNA) methods. On the eDNA quantification of Japanese eel (*Anguilla japonica*) by the real-time qPCR, the eDNA concentrations of Japanese eel at the sites with Chutaro tended to be higher than those of Japanese eel in the sites with concrete revetment. On the other hand, there were not significant differences in species richness and compositions of fishes and decapods regardless of the presence and absence of Chutaro. These results suggest that Chutaro could provide *A. japonica* with their habitats and could be useful for the nature-oriented river works.

Key Words : eDNA, MiFish, MiDeca, Japanese eel, ductile iron basket

1. はじめに

近年、人間活動にともなう河川環境の改変によりダムや堰堤、コンクリート護岸などの人工構造物が建造され、水生生物を取り巻く環境は劣化してきた¹⁾。特に河川水際のコンクリート護岸化は、陸域と接する重要な水際環境(エコトーン)の喪失につながり、水際の多様な環境を利用する魚類や甲殻類の多様性や生物量に影響を与えていることが知られている^{2,4)}。また、河道の改修にともなう直線化などが魚類の種数や生息密度に負の影響を与えることがわかっている³⁾。

近年、河川が本来有している生物の生息・生育・繁殖環境及び多様な河川景観を保全・創出するために河川管理をおこなう「多自然川づくり」の取り組みがとられる

ようになっている⁶⁾。多自然川づくり基本指針の留意事項のひとつとして、護岸の設置区間を最小限にし、生物の生息・生育・繁殖環境と多様な河川景観の保全・創出に配慮した適切な工法とすること、という項目がある。河川における水際環境は、魚類の生息場や採餌場、繁殖場として利用されるなど、さまざまな機能を有している⁷⁾。また、植生によるカバーができることで、捕食者から狙われなくなる退避場としての効果も有している。

このような水際環境の創出のために、多自然川づくりにむけた護岸整備と環境改善の技術が取り入れられている。例えば、かごマット工法ではニホンウナギ用の生息かごマットなどが開発されており、ニホンウナギや他の魚類の生息場の創出や餌生物となる甲殻類の蟄集効果がみられている、また、コンクリート護岸となった場所への生息場の提供として、石倉カゴの設置による生息場の



図-1 鑄田籠の全体図と基本構造

創出などが取り組まれている⁸⁾。かご工法における新たな手法の1つとして、ダクタイル鑄鉄かご工法「鑄田籠」があげられる。鑄田籠は、鑄鉄枠内に多くの空隙を生む構造となっていることから、前述のかご工法と同様にニホンウナギの生息場としての有用であること、現地発生材の利用によるコスト削減など自然環境や生態系へ配慮した工法となっている。しかしながら、鑄田籠については水中映像などによる一時的な利用情報はあるものの、ニホンウナギを含めた魚類等の水生生物の生息場や利用環境としての有用性について、定量的な評価はされていないのが現状である。

そこで、本研究では、近年生物モニタリング手法として利用の進んでいる環境DNA手法を用いて、鑄田籠の施工の有無によるニホンウナギの生物量、魚類および甲殻類の種組成について検証し、これら水生生物の生息場としての機能について評価した。

2. ダクタイル鑄鉄かご工法「鑄田籠」

鑄田籠（NETIS 登録 No.CG-990046-V 活用促進技術(旧)）は、ダクタイル鑄鉄製の格子状パネル（高さ 0.5m, 幅 1m, 厚み 16mm）を同素材のくさびで連結することで枠体を形成し、その枠内に自然石や現地発生材、コンクリートの再生材などを詰めて使用する、かご工法の一つである（図-1）。なお、当製品の材質 FCD500 は、静荷重試験であれば、鋼なみの弾性変形及び塑性変形能を有している。鑄田籠は主に河川の護岸工、根固工、護床工に使用され、増水時の洗掘などを防ぐ役割を担っている。また、素材となる鑄鉄は使用後に再度溶解することで、原料の約 90%を再利用することができる。さらに、鑄田籠の製品表面には有機溶剤などの塗装をしておらず、ゴミや有害物質が出ない設計となっている。

鑄田籠は強靱なダクタイル鑄鉄パネル枠で枠体を組み、自然石や現地発生材を中詰石として利用する環境復元型土木工法であるため、大小の中詰石を内



図-2 中詰石の空隙に潜るモクズガニ



図-3 施工後15年後の鑄田籠護岸

部に詰めることで空隙ができ、多くの水生生物にとって生息空間となると考えられる（図-2）。また、施工後は経年によって草本等の基盤となることから、治水の機能を果たしつつ環境を元の状態に復元することが可能である（図-3）。さらに、止水せずに施工できるため、河道や生息する生物への影響を最低限に抑えながら実施できるという利点がある。

3. 対象域および検証方法

(1) 調査地および採水調査

山口県萩市を流れる阿武川河口付近の右岸側には1.6 kmにわたる護岸に鑄田籠が用いられている。また、山口県山口市の島地川の佐波川との合流部付近の右岸に約 65mにわたって鑄田籠を用いた護岸が施工されている。この二か所において阿武川では鑄田籠のある地点とない地点を含めて合計7地点、島地川では合計3地点を調査地点に設定した（図-4）。2019年9月11日に各調査地点において表層水1 Lを採水し、環境DNA分析用のサンプルとした。採水したサンプルは、現地で10 w/v% 塩化ベンザルコニウム水溶液を1mL添加し、1Lの脱イオン水を加えたボトル（クーラーブランク）とともに冷蔵状態で大学に持ち帰り、グラスファイバーフィルター（粒子保持能0.7 μm , GF/F, GEヘルスケア）を用いてろ過し、DNA抽出までアルミホイルで密封し、 -20°C で凍結保存した。

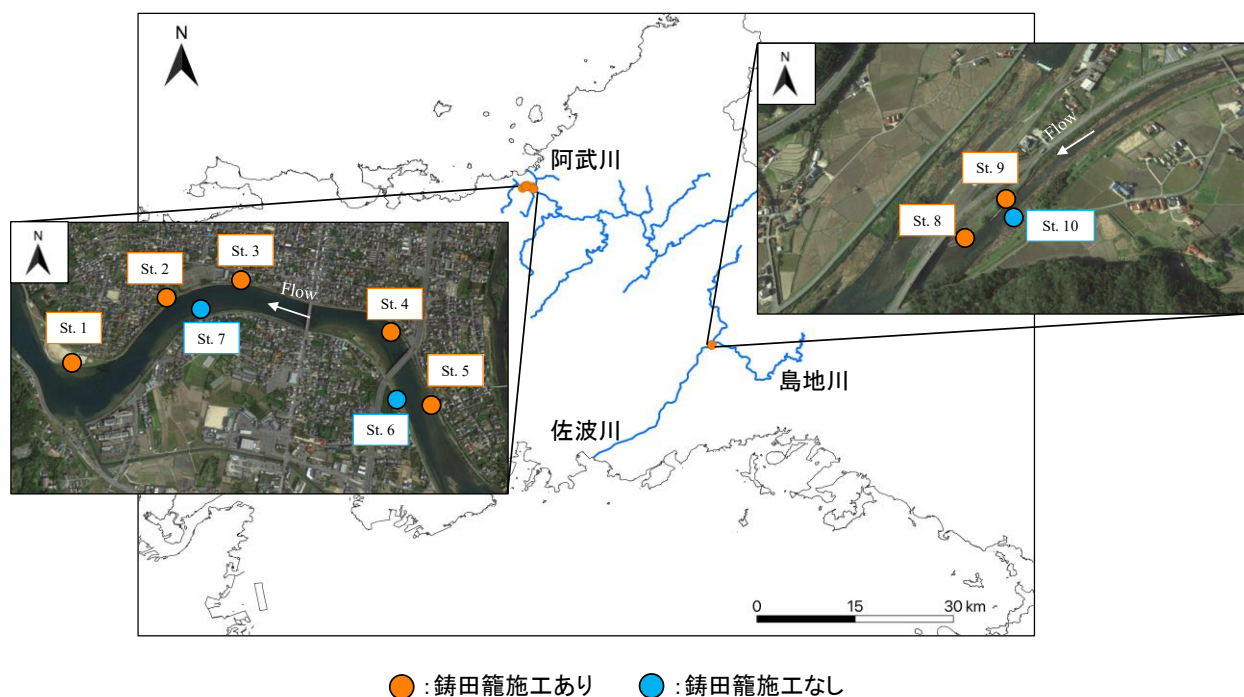


図-4 本研究における調査地の概要

(2) 環境DNA分析

ろ紙からのDNA抽出は、環境DNA学会発行の調査・分析マニュアル⁹⁾に従い、サリベットチューブ (SARSTEDT) とDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)を用いて最終100 μ LのBuffer AEでDNA溶液を抽出した。環境DNA分析は、ニホンウナギを対象とした種特異的な検出と魚類および甲殻類を対象とした環境DNAメタバーコーディングを実施した。

本研究では、ニホンウナギを対象として、CFX Connect Real-Time PCR Detection System(BIO-RAD)を用いて、リアルタイム定量PCR (qPCR) をおこなった。qPCRに用いたニホンウナギの種特異的プライマーおよびTaqManプローブ、スタンダードDNA配列についてはItakura et al. ¹⁰⁾と同様のものを利用した。サンプルとスタンダードDNAを同時にPCR増幅し、既知濃度のスタンダードDNAによって作成された検量線に基づいて、各サンプルに含まれている環境DNAの濃度を定量した。

環境DNAメタバーコーディングでは、環境DNA用のユニバーサルプライマーMiFish (魚類) ¹¹⁾およびMiDeca (甲殻類) ¹²⁾を用いて、PCRによる魚類および甲殻類のDNA増幅をおこなった。ライブラリ調整における1st PCRからライブラリ精製までの一連の行程については、環境DNA学会発行の調査・分析マニュアルに従って実施した。調整したライブラリをiSeq100 (Illumina) にかけて塩基配列を決定した。iSeq100から出力された塩基配列データを回収し、解析用パイプラインを用いてシーケンスエラー等を排除したのち、データベースとの配列一

致率を魚類では99 %、甲殻類では98.5 %として種を特定した。また、塩基配列から種を決定できなかった分類群については、属レベルでの同定にとどめた。また、10リード以下の種や、淡水域で検出された汽水・海産魚については、潜在的なコンタミや人間活動による影響である判断し、リストから除外した。

4. ニホンウナギの生息場としての機能評価

(1) 環境DNA分析結果および考察

qPCRによるニホンウナギの環境DNA濃度を図-5に示す。ニホンウナギの環境DNA濃度は、鋳田籠の施工地点では1.10-3.98 copies/mLであり、非施工地点では0.00-1.50 copies/mLであった。このことから、鋳田籠の施工ありの地点のほうが、なしの地点に比べてニホンウナギの環境DNA濃度が高くなる傾向がみられた。しかしながら、統計解析の結果、ニホンウナギの環境DNA濃度に対して、施工の有無は有意ではなかった (t検定, $p = 0.144$)。また、本研究でおこなった分析では、ニホンウナギの環境DNAは問題なく検出されたが、DNA濃度自体は低い値となっていた。したがって、萩市街のある阿武川河口域および島地川の合流部周辺では、ニホンウナギが生息しているものの、その生物量はあまり多くない可能性が考えられる。

河川別にみると、阿武川において鋳田籠の施工されている5地点 (St. 1-5) では、環境DNAがある程度検出されているのに対し、施工なしの2地点では1地点で施工あ

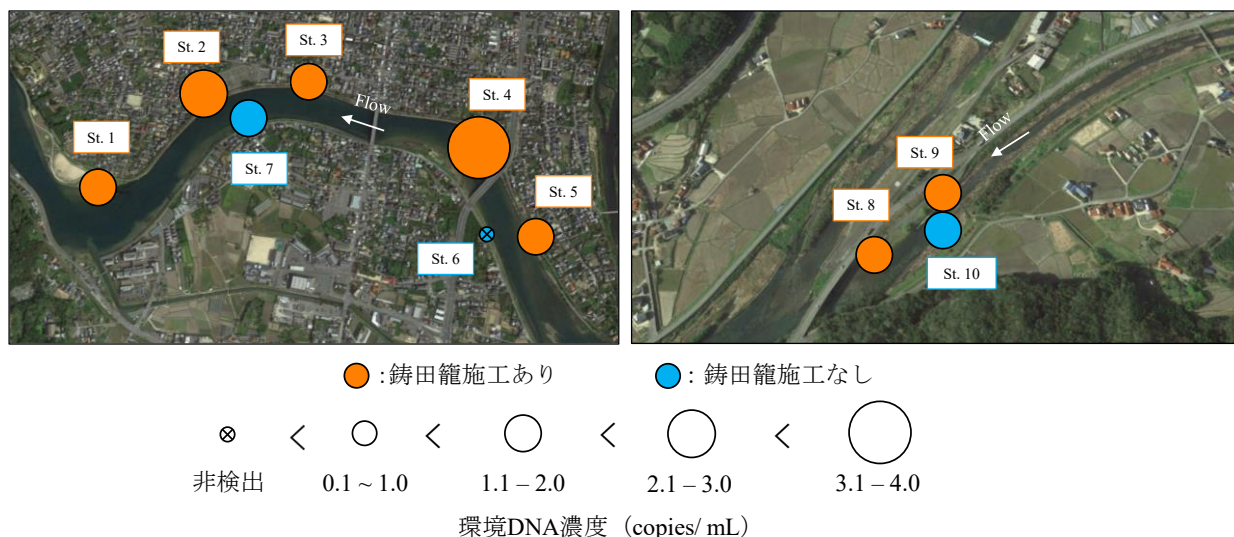


図-5 各地点におけるニホンウナギにおける環境DNA濃度の比較図



図-6 阿武川および島地川における採水地点の様子

りの箇所と同程度、残りの1地点ではDNAが検出されていなかった。鋳田籠の施工されている右岸側において、採水地点の周辺は鋳田籠による空隙の創出だけでなくその周辺に浮石も設置されており、鋳田籠の他にもニホンウナギの生息場として利用できそうな環境が認められた(図-6 (a), (b))。一方で、鋳田籠の施工されていないSt. 6では、水深が浅く、河床はコンクリートで護岸されていた。そのため、St. 6付近はニホンウナギにとって、利用しづらい環境であったと考えられる(図-6 (c))。他方で、St. 7では鋳田籠の施工はなかったが、環境DNAは検出されていた。この地点の河床にはサイズの大きな浮石があったことから、ニホンウナギが生息場として利用できる可能性がある点において、St. 6とは異なると考えられ

る。ただし、St. 6についても後述するメタバーコーディングではニホンウナギが検出されており、この理由としてqPCRにおけるPCR繰り返し等が不足していた可能性や検出対象とする遺伝子領域の違いなどが考えられる。これらについては、今後検討していく必要がある。

島地川では、鋳田籠の施工されている1地点とその下流、および対岸の施工されていない1地点のすべてで環境DNAが検出された。また、地点間の環境DNA濃度には大きな差異はみられなかった。島地川と佐波川の合流部は砂礫底となっており、河床には中礫が多く存在するが、浮石はあまり多くはない環境となっている。そのため、ニホンウナギが利用する環境があるとすれば、施工されている鋳田籠の空隙や施工されていない左岸側に広

表-1 各河川における魚類の環境DNAメタバーコーディングの種リスト

No.	分類群	科	種名	阿武川		島地川	
				施工あり	施工なし	施工あり	施工なし
1	淡水魚	ウナギ科	ニホンウナギ	●	●	●	●
2		コイ科	コイ	●	●	●	●
3			フナ属sp.	●	●	●	●
4			オイカワ	●		●	●
5			ハス		●		
6			カワムツ	●		●	●
7			ウグイ		●		
8			タカハヤ			●	
9			ムギツク	●	●	●	●
10			タモロコ			●	
11			ニゴイ属sp.	●		●	
12			ズナガニゴイ			●	●
13			イトモロコ	●	●	●	
14			カマツカ	●	●	●	●
15		ドジョウ科	ドジョウ	●		●	●
16			ヤマトシマドジョウ			●	
17		ギギ科	ギギ	●	●	●	
18		アカザ科	アカザ			●	●
19		ナマズ科	ナマズ			●	●
20		アユ科	アユ	●	●	●	●
21		サケ科	サケ属sp.			●	
22			サケ属subsp.	●		●	
23			ニジマス			●	
24		メダカ科	ミナミメダカ	●	●		
25		ケツギョ科	オヤニラミ		●	●	●
26		カジカ科	アユカケ	●			●
27		ドンコ科	ドンコ	●		●	●
28		カワアナゴ科	カワアナゴ	●			
29		ハゼ科	ウキゴリ	●	●		
30			ゴクラクハゼ	●			
31			ヨシノボリ属sp.			●	
32			カワヨシノボリ	●	●		●
33			チチブ属sp.	●	●		
34	汽水・海産魚	ニシン科	キビナゴ		●		
35		ボラ科	ボラ	●	●		
36			メナダ	●	●		
37		サヨリ科	サヨリ	●	●		
38		スズキ科	スズキ	●	●		
39			ヒラスズキ	●	●		
40		ハタ科	アオハタ	●			
41		キス科	シロギス				
42		アジ科	アジ属sp.	●			
43			ブリ	●	●		
44		カマス科	アカカマス	●			
45		タイ科	マダイ		●		
46			クロダイ	●	●		
47			キチヌ	●	●		
48		シマイサキ科	シマイサキ	●	●		
49		ハゼ科	ミミズハゼ属sp.	●	●		
50			ビリンゴ	●	●		
51			マハゼ	●	●		
52			アベハゼ	●	●		
53			ウロハゼ	●	●		
54			ヒナハゼ	●	●		
55			アシシロハゼ	●	●		
56		ヒラメ科	ヒラメ	●			
57		フグ科	クサフグ		●		
出現種数（魚類）				45	38	25	21

注) 種名が「属sp.」となっているものについては、環境DNAメタバーコーディングで種判別ができなかった種を示す。
注) 島地川は純淡水域であるため、汽水・海産魚のリストから除外している。

がっている植生帯になると考えられる。特に植生帯は流れが緩やかになっており、右岸側でも鍍田籠の施工箇所の上流部には植生帯が形成されていた（図-6 (e),(f)）。これらのことから、島地川において、ニホンウナギが利用できそうな環境が両岸にあったため、すべての地点で環境DNAが検出されたのではないかと考えられる。

5. 魚類および甲殻類の生息場としての機能評価

(1) 魚類相への機能評価

環境DNAメタバーコーディングの結果を表-1に示す。魚類は、57種の魚類を検出した。このうち淡水魚は33種、汽水・海産魚は24種であった。河川別にみると、阿武川では施工ありの地点で45種、施工なしの地点で38種であり、島地川では施工ありの地点で25種、施工なしの地点で21種であった。鍍田籠の施工地点と非施工地点の魚類の種多様性を比べると、施工地点のほうが検出された総

表-2 各河川における甲殻類の環境DNAメタバーコーディングの種リスト

No.	分類群	科	種名	阿武川		島地川	
				施工あり	施工なし	施工あり	施工なし
1	甲殻類	モクズガニ科	モクズガニ	●		●	
2		サワガニ科	サワガニ			●	●
3		テナガエビ科	テナガエビ属sp.		●		
4			スジエビ	●	●		
5		ヌマエビ科	カワリヌマエビ属sp.		●	●	●
6		アメリカザリ	アメリカザリガニ			●	●
出現種数（甲殻類）				2	2	4	3

注) 種名が「属sp.」となっているものについては、環境DNAメタバーコーディングで種判別ができなかった種を示す。

種数が多くなる傾向がみられた。しかしながら、全体的な種組成に大きな違いはなく、鍍田籠の施工の有無で魚類相が大きく変化することはなかった（t検定、 $p = 0.594$ ）。

阿武川において、施工地点でのみ検出された種は淡水魚で多く、ドジョウ、ナマズ、アユカケ等の底生魚が中心であった。これらの種は、砂に潜る種や隠れ家が必要とする種などであることから、鍍田籠や礫底の環境が好適であった可能性がある。また、汽水・海産魚では施工地点でのみ検出されたものが4種、施工なしの地点でのみ検出されたものが2種であったが、遊泳性の種がほとんどであったことから、それぞれの地点で偶発的にDNAを検出できただけであり、施工の有無と大きく関連しているとは考えられなかった。

島地川においては、施工ありの地点でのみサケ属、マス類、ニジマスなどのサケ科魚類およびニゴイ属、ヨシノボリ属が検出された。マス類およびニジマスについては上流の島地川ダムに生息していることから、下流へ流されてきた個体を検出した可能性がある。一方で、施工なしの地点でのみアカザが検出されていた。底質が砂礫底である島地川の地点は本種の好む環境が多くなっているが、空隙を好む種でもあることから、鍍田籠を利用している可能性も高いと考えられる。しかし、今回施工なしの地点でのみ検出されており、この原因については今後検討していく必要がある。

(2) 甲殻類相への機能評価

環境DNAメタバーコーディングの結果を表-2に示す。本研究でおこなった甲殻類の環境DNAメタバーコーディングでは、5科6種と魚類に比べて非常に少なく、魚類と同様に施工の有無による違いはみられなかった（検定、 $p = 0.843$ ）。テナガエビ属およびカワリヌマエビ属については、属内に複数種を含んでいるため、実際の種数は少し増加する可能性がある。

種ごとにみていくと、阿武川では施工地点でのみモクズガニが検出された。本種はすでに鍍田籠を利用することがわかっており、鍍田籠への生息を環境DNAでも再現できたと考えられる。一方で、非施工地点でのみ、テナガエビ属が検出されていた。検出されたSt. 6は底質もコンクリートで護岸された平地であることから、採水地点よりも上流側に生息している本属のDNAを拾ってい

た可能性が高い。島地川では施工地点のみ外来種のアメリカザリガニが検出されていた。本種は本来止水性の環境を好むことから、佐波川との合流地点で流速の早い調査地をあまり好まないと考えられる。ただし、調査地には鍔田籠が施工されていることから、そこを生息場とすることで定着しているのかもしれない。また、施工の有無によらず検出された種には、スジエビ、サワガニ、カワリヌマエビ属の3種であった。

本研究で検出された甲殻類は約6種と少数ではあったが、これらの種はすべてニホンウナギにとって好適な餌生物になる種である。ニホンウナギの餌生物は幅広く、ハゼ科などの魚類、エビやカニ等の甲殻類に加え、多毛類やミミズ類などの陸上生物も含まれている¹³⁻¹⁴。これにくわえて、魚類の種多様性も非常に高かったことから、少なくとも餌環境で見える限り、鍔田籠が施工されている地点は、ニホンウナギにとって好適な生息環境である可能性が高い。

6. まとめ

本研究では、環境DNA手法を用いてニホンウナギ、魚類相および甲殻類相を特定することで、ダクタイル鍔鉄かご工法である鍔田籠の水生生物における生息場としての機能評価をおこなった。その結果、施工ありの地点では施工なしの地点に比べて、ニホンウナギの環境DNA濃度が増加することが明らかとなった。また、施工ありの地点では魚類の種数が全体的に増加する傾向がみられたが、全体的な種組成に大きな違いはみられなかった。環境DNA手法でのみ検出された魚種は、底生かつ空隙を好むものが多かったことから、鍔田籠を生息場として利用している可能性が示唆された。甲殻類についても、本研究では検出された種数が少なかったことから、施工の有無で種組成に明確な違いはみられなかった。今後、他の地点での結果を蓄積していくことで、設置の有無による影響をより詳細に理解できる可能性がある。また、鍔田籠の設置前後での水生生物相を比較することで、設置や施工そのものの影響を評価する必要があると考えられる。

謝辞：本研究は令和元年度やまぐち中小企業活力アップ補助金「鍔田籠技術を用いた環境保全型魚礁の開発」の助成を受けた。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) 森誠一，緒言：自然への配慮と理解，森誠一（編）：淡水生物の保全生態学—復元生態学にむけて—，pp1-6, 1999.
- 2) Itakura H., Kaino T., Miyake Y., Kitagawa T. and Kimura S.:

Feeding, condition, and abundance of Japanese eels from natural and revetment habitats in the Tone River, Japan, *Environmental Biology of Fishes*, 98, 1871-1888, 2015.

- 3) Saito M., Yamashiro T., Hamano T. and Nakata K.: Factors affecting distribution of freshwater shrimps and prawns in the Hiwasa River, southern central Japan, *Crustacean Research*, 41, 27-46, 2012.
- 4) 川口洋一，水辺の植生が河川性魚類の生態に及ぼす影響，*海洋と生物*，25 (6), 452-459, 2003.
- 5) 島谷幸宏，小栗幸雄，萱場祐一：中小河川改修前後の生物生息空間と魚類相の変化，*水工学論文集*，38，337-344, 1994.
- 6) 国土交通省：「多自然川づくり基本指針」の策定について。
http://www.mlit.go.jp/kisha/kisha06/05/051013_.html
- 7) 飯野哲也：河川中流域の魚類に対する河畔植生の効果について，*埼玉県農林総合研究センター研究報告*，5，47-54, 2005.
- 8) 原田真実，久米 学，望岡典隆，田村勇司，神崎東子，橋口峻也，笠井亮秀，山下 洋：大分県国東半島宇佐地域の伊呂波川と桂川に設置したウナギ石倉かごにより採集されたニホンウナギと水生動物群集，*日本水産学会誌*，84, 45-53, 2018.
- 9) 一般社団法人環境DNA学会：環境DNA調査・分析マニュアル Ver. 2.1 (2019年4月25日発行).
- 10) Itakura H., Wakiya R., Yamamoto S., Kaifu K., Sato T. and Minamoto T.: Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale, *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystem*, 29, 361-373, 2019.
- 11) Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J.Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M. and Iwasaki W.: MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes, *Royal Society open Science*, 2, 15088, 2015.
- 12) Komai T., Goto O. R., Sado T. and Miya M.: Development a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans, *Metabarcoding & Metagenomics*, 3, 1-19, 2019.
- 13) 海部健三，水産庁，環境省自然環境局野生生物課，望岡典隆，パルスシステム生活協同組合連合会，山岡末季，黒田啓行，吉田丈人：日本におけるニホンウナギの保全と持続的利用に向けた取り組みの現状と今後の課題，*日本生態学会誌*，68，43-57, 2018.
- 14) Itakura H., Kaino T., Miyake Y., Kitagawa T. and Kimura S.: Feeding, condition, and abundance of Japanese eels from natural and revetment habitats in the Tone River, Japan, *Environmental Biology of Fishes*, 98, 1871-1888, 2015.

(2020. 4. 2受付)