

環境 DNA によるアユの仔稚魚の動態把握

株式会社 建設技術研究所
研究担当者：瀬口 雄一 澤樹 征司

【要旨】

□アユは日本の河川における代表的な魚類であり、その保全に際しては河川と海域の連続性の確保が重要と指摘されているものの、既往調査では産卵・孵化後に河口部へ流下した後のアユの動態を的確に把握できていない現状がある。環境 DNA によってアユの仔稚魚の生息場所を時空間スケールで把握できれば、今後のアユの保全を検討する上で重要な知見を得ることができる。ここでは淀川河口部における観測事例を報告する。

キーワード：環境 DNA、アユ、仔稚魚、動態把握

1. はじめに

アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* は極東地域に分布する両側回遊魚で、その生活史は秋から冬にかけて河川の上流部から降下してきた親魚が河川の下流部で産卵するところに始まり、孵化した仔魚は川の流れによって河口部や海域に運ばれる。さらに翌春、河口部や海域で成長した若魚が河川に遡上し、河川の上中流部で成魚になることを繰り返す（高橋・東，2006）。

国土交通省の策定済みの 107 水系の河川整備計画において、31 水系においてアユの生息環境を保全することが整備目標となっており、45 水系については河川の代表的な環境要素としての記述があり、我が国においては河川の代表的な魚類であると考えられるものの、その漁獲量は 1990 年代をピークに減少傾向にある（図-1 参照、農林水産省，2019）。アユの漁獲量の減少は、海水温の上昇やカワウによる食害、冷水病の蔓延など様々な要因が複雑に影響していると想定されている（例えば、井口，2011；芦澤ほか，2011；川之辺ほか，2005）。

一方で、アユの個体群に着目すると、個体数は産卵時が最大であり、その後、河口部への流下の時点で最も個体数が減少することから、アユの保全を検討する上では、この河口部・海域部におけるアユの動態（減耗）を的確に把握することが望まれる。しかし、アユの遡上期や河川定着期は比較的精度の高い個体数推定が実施されているのに対し（例えば、国土交通省淀川河川事務所，2019）、年級個体群の減少が著しい流下期の個体数や、その後の河口部・海域部で生活するアユの個体群の動態は、ほとんど把握されていない。同様に、河川定着期におけるアユの分布については、環境 DNA による把握が試みられているのに対し

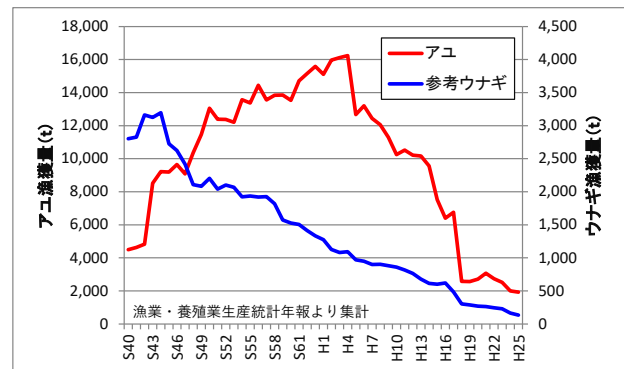


図-1 アユの漁獲量の変遷

（例えば、乾ほか，2017）、河口・海域における環境 DNA による把握は、これまでのところ事例がない。そこで、本研究は国土交通省等の調査によりアユの遡上数や流下仔魚数の情報が入手可能な淀川河口域（大阪府）において、環境 DNA と採集によるアユの仔稚魚の分布状況の把握を行い、環境 DNA が河口部・海域におけるアユの仔稚魚の動態を把握する手法となりうるかの検討を行った。

2. 研究方法

2.1 淀川河口部におけるアユの採集

淀川河口部におけるアユの仔稚魚の動態を把握するために、淀川大堰より下流側に 5 地点、旧淀川に 5 地点の調査地点（流心・表層）を設け（図-2 参照）、2018 年 11 月～2019 年 1 月にかけて月 1 回、稚魚ネットの曳航による採集調査を実施した（図-3 参照）。ただし、11 月については、淀川大堰より下流側の 5 地点のみで 2 回採集している。同時に、12 月と 1 月については、環境 DNA のサンプルとして、採集地点と同一の流心・表層、さらには流心・中下層（底層から 4 割の水深）



図-2 アユ仔稚魚の採集地点（2018年）



図-3 稚魚ネットと曳航状況

と河岸部において1リットルの採水を行った。なお、同時期に実施された淀川大堰と毛馬水門におけるアユの流下仔魚調査によって、毛馬水門（旧淀川）には淀川大堰下流よりも約38倍の仔魚が流下していると推定されている（瀬口ほか，2019）。

2. 2 環境DNAの分析

1) 採取手法と濾過手法の組合せ

表層のサンプル採取はサンプル瓶を用いて直接採水し、中底層の採取はバンドーン採水器を採水層に降ろして行った。この際、他地点の環境DNAの影響を回避するために十分に“共洗い”を行った。その後、塩化ベンザルコニウムの濃度が0.01%となるように添加したサンプル系群と、フィルターユニット（商品名：ステリベクス；孔径0.45μm）で濾過する系群を設定した。また、塩化ベンザルコニウムを添加する系群では、一部の地点で2サンプル採取した。

2) DNAの濾過と抽出

現地で塩化ベンザルコニウムを添加したサンプル系群については、実験室内でグラスフィルター（Whatman GF/F 47mm: GE Healthcare社製）を用いて吸引濾過し、生物代謝物の濃縮を実施した。濾過の際は沈殿物を避けて上清を用い、サンプル500mLあたり1枚（1サンプルあたり2枚）を使用した。濾過後のフィルターは、-20℃で凍結保管した。DNAの抽出に際してはProteinaseKを含んだ溶解液を添加後、56℃で30分インキュベートしてDNAの溶出を行い、DNeasy blood and tissue kit（Qiagen社製）を用いてフィルターからのDNA抽出・精製を行った（回収液量100μL）。抽出されたDNA溶液は-30℃で凍結保存した。フィルターユニットによる濾過サンプルは、ステリベクス内にBuffer ATL 720μL + Proteinase K 80μLを添加し、56℃

で40分インキュベートした後、DNeasy blood and tissue kitに付属するカラムで精製し、1サンプルあたり50μLのBuffer AEを用いてDNAを溶出し、塩化ベンザルコニウム添加サンプル系群と同様に-20℃で凍結保管した。

3) 分析手法の開発

各サンプル系群についてThermo Fisher scientific社製QbitおよびAgilent社製Tape Stationを用いて、得られたDNAの濃度および品質の確認を行った。アユのDNA定量は、Thermo Fisher Scientific社製Quant Studio 3リアルタイムPCRシステム、Yamanaka et al. (2016)のプライマーを用いて行った。TaqMan gene expression Master Mixを用いた予備検討では、Total volume 15μL（サンプルDNA 2μL）の分析系において、いずれもアユを検出しなかった。これは、サンプル中に含まれるアユのDNAが少ない可能性が考えられたため、1wellあたりのDNA量を増やすとともに、PCR阻害物質の影響を受けている可能性も考慮し、より阻害物質の影響を受けにくいとされる酵素を使うことで、より再現性の高い結果が得られるようPCR条件の検討を行った。比較の結果、最終的にはPCR反応液を25μL/wellとし、その組成をDNAサンプルが2.5μL、Taq Path Master Mixを12.5μL、各10pmol/μLのFプライマーを2.25μL、Rプライマーを2.25μL、5pmol/μLのTaq Man Probeを1.25μLを基本とした。但し、サンプルDNAが不足する地点についてはTotal Volumeを20μL、DNAサンプル2.0μLとした。PCRの温度条件はUNG処理を50℃で2分、初期変性を95℃で10分の初期ステップの後、95℃で15秒、60℃で1分の温度条件で50サイクルの定量PCR分析を行った。

全ての分析は、分析者や機材によるばらつきの可能性を排除するため、作業ステップごとに同じ電動ピ

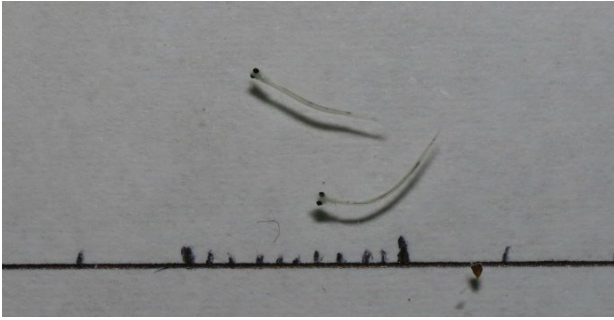


図-5 採集されたアユ仔魚 (2018年)

ペットを用いたが、定量限界付近の低濃度領域におけるスタンダード DNA のばらつきを解消するには至らなかった。そのため、同一プレート内においてコンタミネーションが疑われたケースを排除したうえで、1検体当たり3回繰り返して分析し、3回中2回以上のwellに増幅が確認された地点を「在」とし、それ以下の回数については「不明瞭(≒不在)」と判断した。

3. 研究結果

3.1 アユ仔稚魚の採集結果

淀川河口部で採集されたアユの仔稚魚は表-1のとおりである(図-5参照)。11月については、淀川大堰下流の新淀川で広く確認されたものの、12月以降は旧淀川河口部の「ふとう前」のみでの確認となった。

また、採集されたアユはいずれも体長が8mm程度の仔魚であった。

3.2 環境DNAによるアユの在・不在の推定

アユのDNAの確認状況は表-2のとおりである。2018年度12月は新淀川の全域の流心・表層で確認され、中底層でも伝法橋を除く全ての地点で確認された。なお、河岸部では十三で確認されなかった。しかし、1月になると確認地点・箇所が減少し、確認があったのは表層では最上流の大堰直下のみとなり、中底層ではJR鉄橋と新淀川河口のみとなった。また、河岸部では十三とJR鉄橋のみで確認され、12月と比較すると局所的となったものの、引き続き新淀川で確認があった。

旧淀川では、12月はいずれかの場所でいずれかのサンプルで確認されたものの、1月は天保山とふとう前の下流部に集中した。なお、塩化ベンザルコニウムを添加しグラスファイバーフィルターを利用して濾過したサンプルと現地にてフィルターユニットで濾過したサンプルの検出能は、後者の方が高い傾向があった。また、同じ塩化ベンザルコニウムによる2つのサンプルでも検出傾向は必ずしも同じではないことから、アユの仔魚を検出するためには1リットルの採水では不足するのかもしれない。

表-1 採集されたアユ仔魚 (2018年)

		新淀川					旧淀川				
		河口	伝法橋	JR鉄橋	十三	大堰直下	北港漁協	ふとう前	天保山	安治川	市場前
11月	1回目	9	0	0	0	0	—	—	—	—	—
	2回目	17	3	6	2	2	—	—	—	—	—
12月		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1月		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

表-2(1) 地点・サンプル別のアユ DNA の有無 (2018年)

採取日	採取位置	流心						河岸			
		表層			中底層			表層			
		OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	
12/22	新淀川	大堰直下	○		○	○			○		
	十三	○		○	○			ND			
	JR鉄橋	○		○	○		○	○		○	
	伝法橋	○		ND	?			?			
	新淀川河口	○		ND	○		○				
旧淀川	市場前	?		ND	○			○			
	安治川水門	○		○	ND			○			
	天保山	ND		○	ND			ND			
	ふとう前	ND		○	○						
	北港漁港	ND		○	○		○				

表-2(2) 地点・サンプル別のアユ DNA の有無 (2018 年)

採取日	採取位置	流心						河岸			
		表層			中底層			表層			
		OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	
1/19	採取層										
	サンプル処理	OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	OS	OS-2	ST	
	新淀川	大堰直下	○		ND	ND			ND		
		十三	ND		ND	ND			○		
		JR鉄橋	ND	ND	ND	ND	ND	○	ND	ND	○
伝法橋		ND		ND	ND			ND			
新淀川河口		ND	ND	ND	ND	○	○	ND	ND	ND	
旧淀川	市場前	ND		ND	ND						
	安治川水門	ND		ND	ND						
	天保山	○		○	ND						
	ふとう前	ND		○	○						
	北港漁港	ND		ND	ND						

OS : 塩化ベンザルコニウム添加 ST : フィルターユニット ○ : 在判定 ND : 不在判定 □ : 不明瞭

3. 3 環境 DNA によるアユの動態の推測

上述のとおり、11 月以外は淀川河口部でアユの仔稚魚がほとんど確認されなかったため採集結果と環境 DNA の照合による検証は出来なかった。そのため、12 月以降のアユの動態は、主に環境 DNA の有無によりを推測する。

11 月から 12 月にかけて下流部の流心表層部を流下した仔魚は下流部の全域で分布するようになる。1 月になると中底層あるいは海域へ移動すると考えられた。その後、別途の採集記録から勘案すると、2 月頃から

河岸へ接岸し、その後、3 月頃から遡上を開始すると考えられる (図-6 参照)。なお、前述のとおり旧淀川には新淀川の 38 倍の仔魚が流下しているにも関わらず、旧淀川の下流部では環境 DNA による確認が少なかったことから、大阪湾を介して他の流域 (例えば隣接する大和川) に逸出している可能性が考えられる。

高橋 (2004) は、高知県四万十川河口部におけるアユの仔稚魚は、流下後、河床付近に着底し、その後、内湾生活を経て、前期孵化群は砂浜に接岸し、後期孵

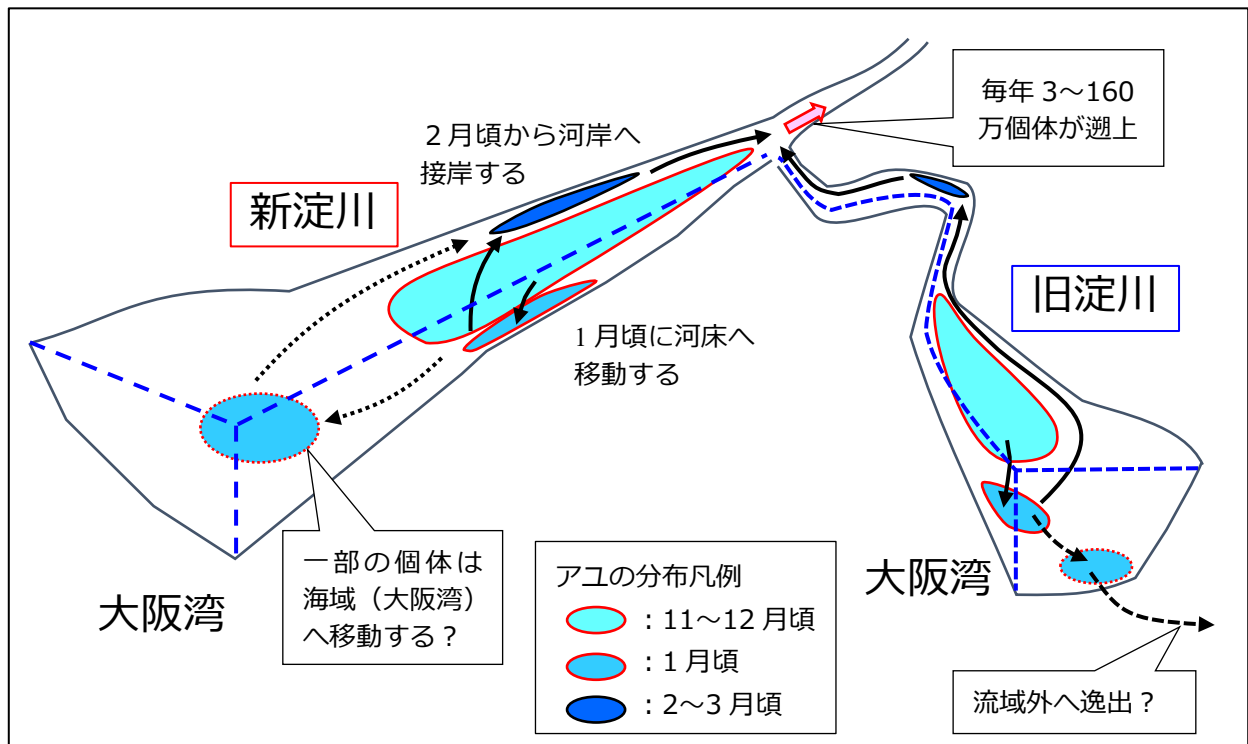


図-6 淀川下流部におけるアユ仔稚魚の動態

化群は海域等からの浮遊生活から直接河川へ遡上すると報告している。一方で、田子ほか（2009）は、富山湾では塩分躍層に阻まれて流下仔魚は河床に辿りつけず、着底しないとしている。

新淀川の塩分を鑑みると、淀川大堰からの淡水の流入が極めて少なく、強混合であることから塩分躍層は存在せず、田子ら（2009）の報告したような富山湾のような状況は発生しないと考えられる。そのため、今回の環境 DNA の結果を踏まえた淀川におけるアユの仔魚の動態は、高橋（2004）の報告と同じく、一度河床付近に着底した後に、河岸あるいは海域へ移動することが窺えた。

4. まとめ

本研究では、河口部におけるアユ仔稚魚の動態把握に環境 DNA の適用の可能性について検討を行った。その結果、以下のことがわかった。

- 1) 環境 DNA によるアユ仔稚魚の在・不在の推定は、実際の在・不在との整合には課題が残るものの、稚魚ネットが利用できない場所（水深帯）でも探索を可能とするツールになりうる考えられる。
- 2) 今回の研究では、アユの環境 DNA の定量分析ができず、さらには採集結果と照合が出来なかったことから、環境 DNA による仔稚魚の生息量を定量的に推定することはできなかった。
- 3) 淀川河口部とそれに接続する大阪湾におけるアユの動態を環境 DNA の視点で追跡する必要がある。

次年度も同様の調査を実施し、アユの動態の普遍性を把握するとともに、アユの採捕結果との整合から環境 DNA により定量把握を行う手法の検討を行う予定である。

謝辞

環境 DNA のサンプリングに際しては京都大学防災研究所竹門准教授並びに大阪市漁業協同組合、京の川の恵みを活かす会のご協力を頂きました。ここに御礼申し上げます。

参考文献（引用順）

- 1) 高橋勇夫・東 健作：ここまでわかったアユの本，築地書館，東京，265pp，2006
- 2) 農林水産省：内水面漁業生産統計調査，https://www.aff.go.jp/j/tokai/kouhyou/naisui_gyosei/（2020.1.2 閲覧）
- 3) 井口恵一郎：アユを絶やさないための生態研究，日本水産学会誌，77 巻 3 号，356-359，2011
- 4) 芦澤晃彦・坪井潤一：魚類食害軽減のための繁殖抑制によるカワウ个体群管理，山梨県水産技術センター報告書，38-43，2011
- 5) 川之辺素一・沢本良宏・山本聡：千曲川におけるアユの放流効果と冷水病の関係，長野県水産試験場研究報告，7，巻 10-5，2005
- 6) 国土交通省淀川河川事務所：第 40 回淀川環境委員会資料-3，https://www.kkr.mlit.go.jp/yodogawa/activity/comit/kankyo_iinkai/bd083b000000rq5-att/03.houkoku.pdf（2019.3.27 閲覧）
- 7) 乾隆帝・後藤益滋・河野誉仁・赤松良久・掛波優作・一松晃弘：江の川における環境 DNA 分析を用いたアユの定量化と生物量に影響を与える環境要因の検討，土木学会論文集 B1(水工学)，73 巻，1105-1110，2017
- 8) 瀬口雄一・竹門康弘・角哲也・稲垣茂人：淀川の流量が天然海産アユ个体群に及ぼす影響．河川技術論文集，25 巻，423-428，2019
- 9) Yamanaka, H., Minamoto, T., "The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity", Ecological Indicators, Vol. 62, 147-153, 2016
- 10) 高橋勇夫：四万十川河口域におけるアユの初期生活史に関する研究，海洋生物教育研究センター報告書，23 巻，113-173，2004
- 11) 田子泰彦・粕谷貴史・安井慶亨：増殖場における日中のアユ仔魚の分布水深，富山県農林水産総合技術センター水産研究所研究報告，1 巻，33-41，2009