



環境DNA定量解析を用いた生物分布モニタリング

～長良川・揖斐川におけるアユと冷水病菌の季節的相互関係を探る～

岐阜県立岐阜高等学校自然科学部生物班 常川光樹 廣瀬雅恵

アユに関する背景

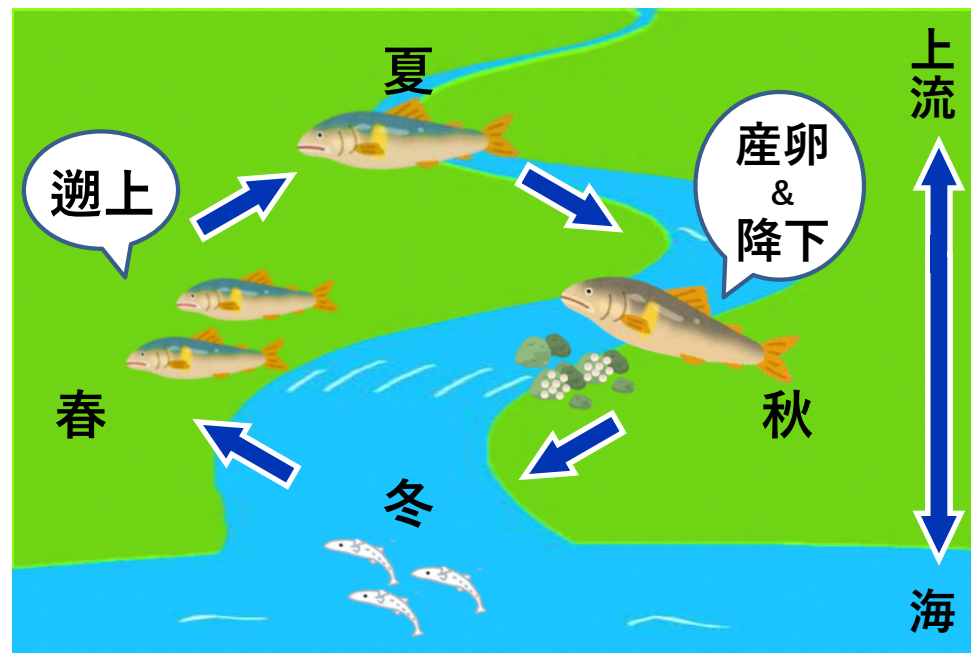


図1 アユの生活史



図2 長良川のアユ

アユとは

- ・アユ (*Plecoglossus altivelis*) は成長段階に応じて、**河川全域を移動する回遊魚**に分類される¹⁾。
- ・1年で生涯を終える**年魚**である。
- ・岐阜県の総漁獲量の約7割をアユ漁獲量が占めており、**水産資源として非常に重要**である²⁾。
- ・アユは岐阜県の伝統文化である鵜飼において漁獲され、観光資源としても重要な役割を持つ²⁾。
- ・かつて全国1位であった**岐阜県のアユ漁獲量は大幅に減少**し、最盛期の1725 tから現在の498 tにまで落ち込んだ³⁾。

目的 アユの資源量を把握し、水産資源管理に貢献

環境DNAについて

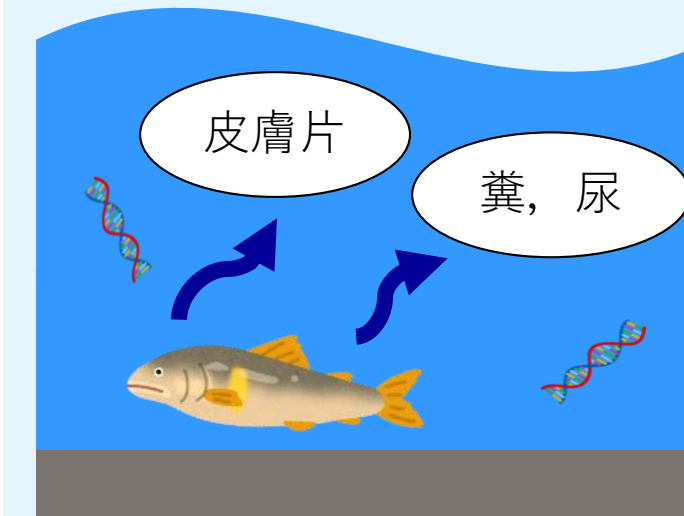


図3 環境DNA



図4 岐阜県周辺地図

環境DNAとは

- ・環境DNAとは、主に環境下に存在する**生物の皮膚片や尿などに由来するDNA断片**を指す⁴⁾。
- ・環境DNAを解析することにより、**調査対象種の生息の有無やその生物量を水を汲むだけで把握できる**⁴⁾。
- ・生物を傷つけることなく、**効率的な生物分布モニタリング**が実施可能であるとして、環境DNA調査は近年注目を浴びている⁴⁾。
- ・環境DNA調査は、従来のアユの分布調査には多大な労力と時間が必要であるという課題を解決する。
- ・環境DNA調査は、従来の冷水病菌の検出法では定量的な解析が困難であるという課題を解決する。
- ・本研究では、河川流長が100 kmを超える大河川であり、岐阜県を流れる**長良川・揖斐川**において環境DNA調査を実施した。

I. 河川全域における通年のアユの環境DNA調査

2017年7月から2018年9月までの約1年間、長良川10地点、揖斐川7地点、河口1地点の計18地点で河川水を1 L採取し、ろ過とDNA抽出を行った。その後、リアルタイムPCRを用いた定量解析により河川水1 Lあたりのアユの環境DNA濃度を算出した。解析にはYamanakaらのプライマー・プローブ⁶⁾を用いて、環境水1 L中のアユの環境DNA濃度を算出した。

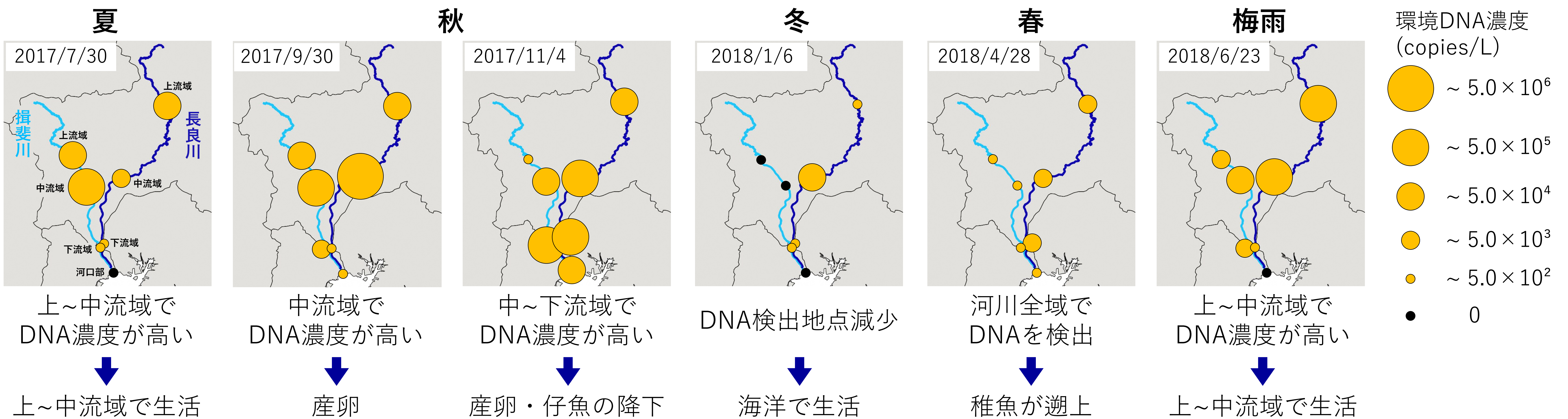


図6 河川全域におけるアユ環境DNA濃度の季節変動

結果 I

アユ環境DNA濃度の季節変動の
パターンは既知の生活史に概ね一致

結論

環境DNA調査による生物分布モニタリングにより、
大河川全域で1年を通してアユの分布状況を効率的に把握できる

II. 産卵期におけるアユの環境DNA調査

2018年11月4日に長良川中流域の約120 m内の範囲にて、アユの産卵場とその約90 m上流、約30 m下流の3地点で13時、16時、18時、20時に河川水を1 L採取した。その後、リアルタイムPCRにより上記と同様にして河川水1 L中のアユ環境DNA濃度を算出した。環境DNA調査と同時に潜水調査を行い、時間帯ごとにアユの産卵の様子を観察した。

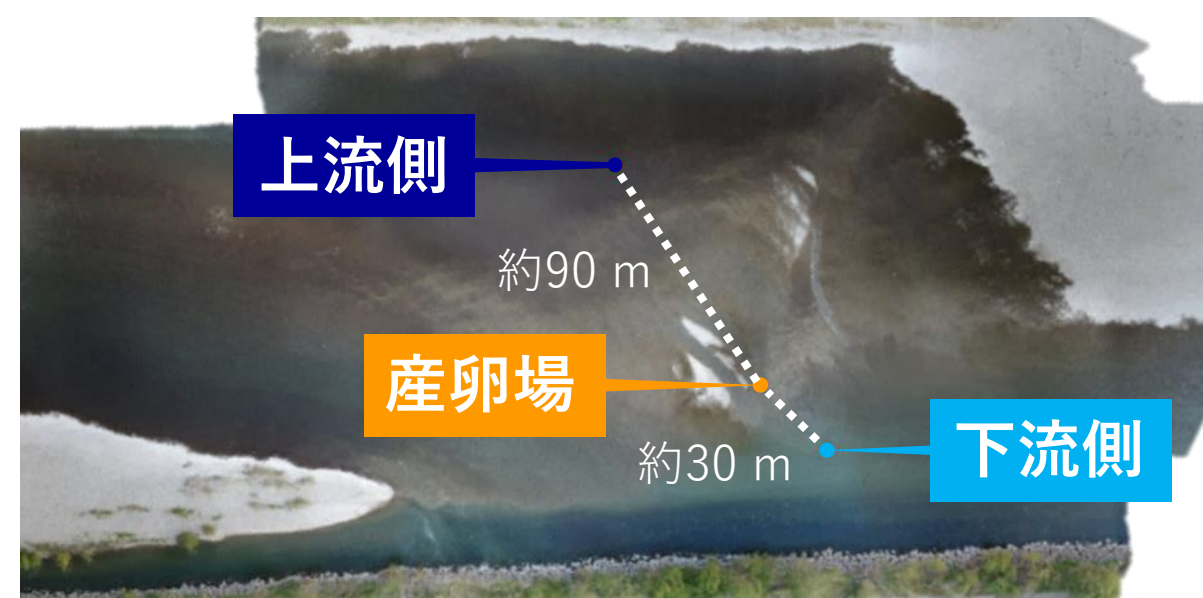


図7 アユ産卵場
写真提供：岐阜大学流域圏科学研究センター

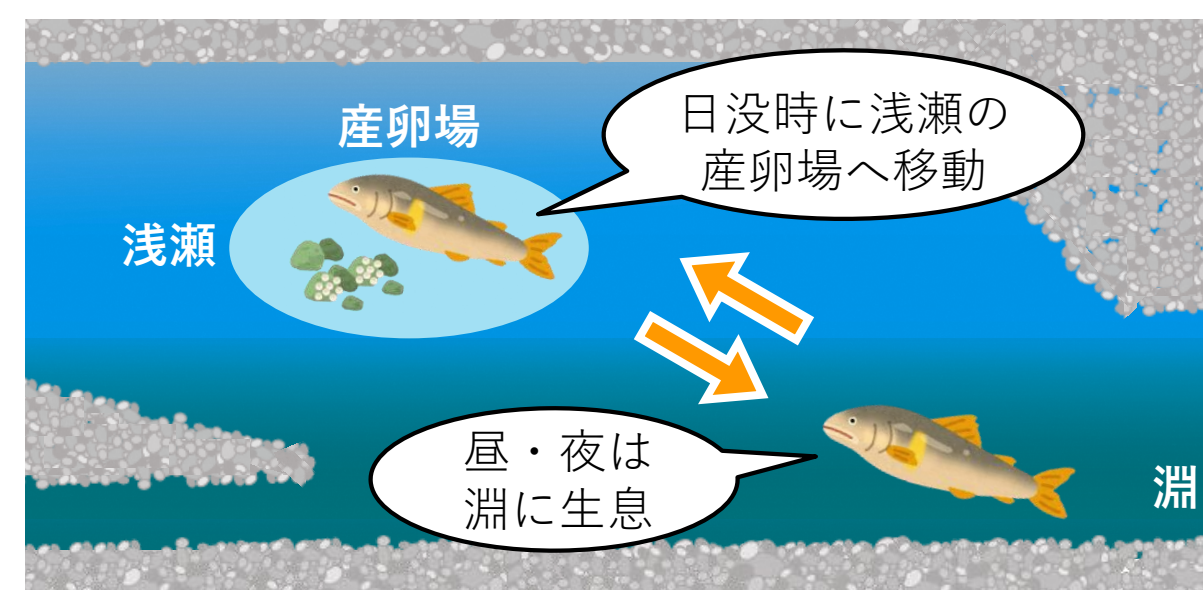


図8 産卵期のアユの生態

結果 II

最も盛んにアユの産卵が
観察された18時の時間帯で
環境DNA濃度が著しく上昇

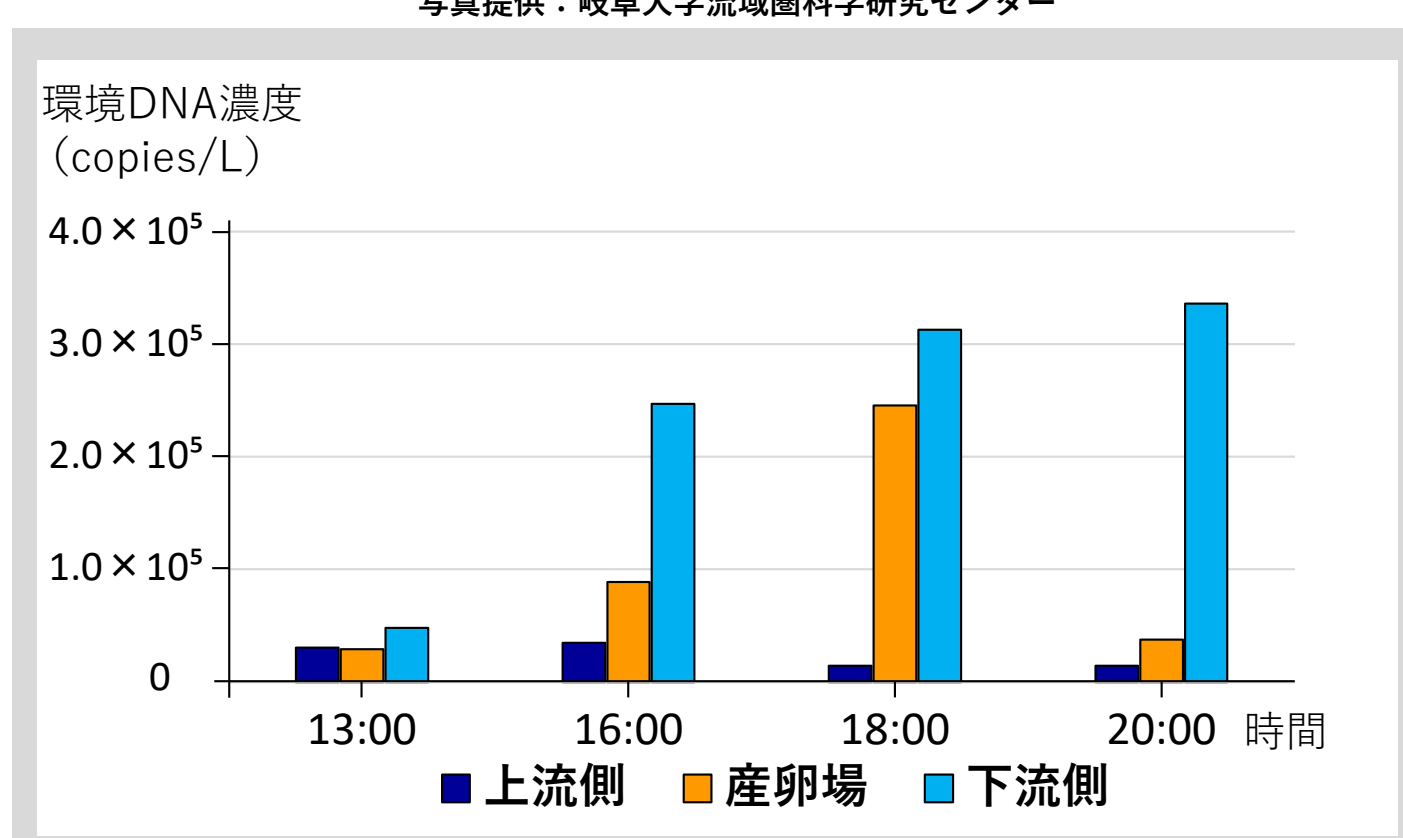


図9 アユ産卵場における環境DNA濃度の時間変動

結果 II・IIIのまとめ

狭い範囲で短時間に連続して環境DNA調査を実施
することで、アユの動態をより詳細に把握できる

III. 遡上期におけるアユの環境DNA調査



図10 長良川河口堰とその周辺

2019年5月6日に、長良川河口部に位置する長良川河口堰周辺約450 m内の範囲にて、河口堰から約200 m上流、約250 m下流の2地点で8時、10時、12時、14時、16時に河川水を1 L採取した。その後、リアルタイムPCRにより上記と同様にして河川水1 L中のアユの環境DNA濃度を算出した。また、同日に河口堰で観測された1時間ごとのアユ遡上数(長良川河口堰管理事務所提供)とアユの環境DNA濃度の時間変動を比較した。

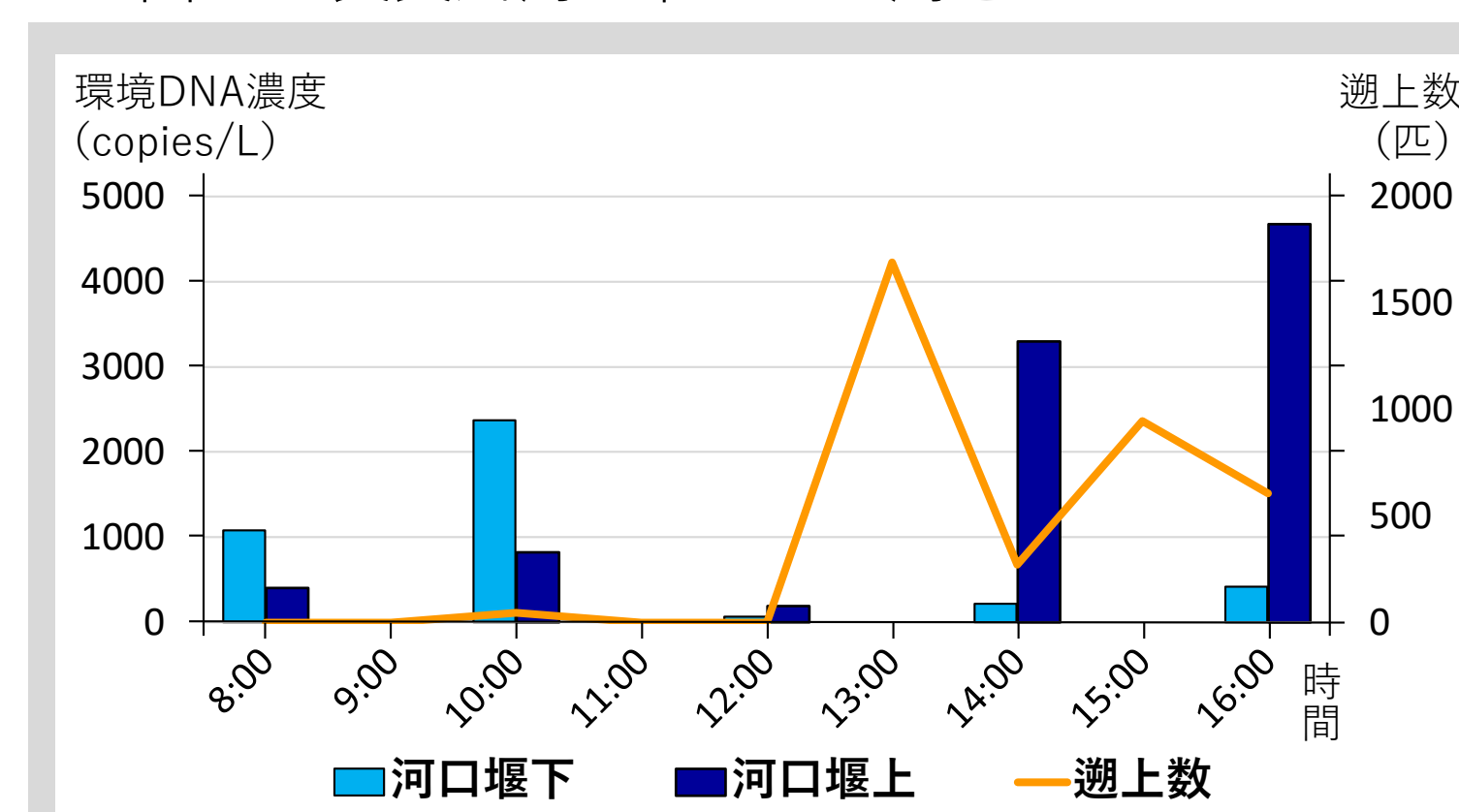


図11 河口堰周辺における環境DNA濃度と遡上個体数の時間変動

結論

環境DNA調査によって生物の分布モニタリング
だけでなく、行動モニタリングも実施できる

目的

- ・環境DNA調査による生物分布モニタリングを長良川・揖斐川で実施し、岐阜県の水産業を支えるアユの水産資源管理に貢献する。
- ・1年を通した河川中の冷水病の動態を把握し、水産業に大きな影響を及ぼす冷水病の対策に貢献する。

まとめ

- ・環境DNA調査により、大河川におけるアユの分布状況を効率的に把握。
- ・環境DNA調査による効率的な生物の行動モニタリングの手法を発見。
- ・今まで明らかにされてこなかった冷水病の流行のメカニズムを解明。
- ・放流事業の延期により放流アユの冷水病被害を軽減できる可能性を発見。

冷水病菌に関する背景

冷水病とは

- ・近年の岐阜県内のアユ漁獲量の減少の一因に**アユ冷水病の被害**が挙げられている⁵⁾。
- ・冷水病を引き起こす**冷水病菌**(*Flavobacterium psychrophilum*)は北米由来の外来生物であるとされる⁵⁾。
- ・冷水病は**5~7月の梅雨前後の時期に流行し**、全国でその被害が問題となっている⁵⁾。
- ・冷水病のアユへの感染時期などは未だに解明されておらず、生態に関して不明な点が多い。
- ・冷水病に対する**有効な対策は未だに確立されていない**。

目的

冷水病菌の生態を解明し、冷水病の対策に貢献する

環境DNA調査の流れ

- ① 河川水を各調査地点で1 L採取した。採水時には各地点で水温を測定した。
- ② ガラスフィルターを用いて河川水をろ過、その後フィルターから環境DNAを抽出した。
- ③ TaqManプローブ法によるリアルタイムPCRを用いて環境DNAの定量解析を行った。本研究では新たに冷水病菌のプローブを開発し、解析した。解析の際には一定濃度に段階希釈した人工合成DNA溶液を解析し、蛍光強度の変動から検量線を作成、検量線を用いて河川水1 Lあたりのアユと冷水病菌の環境DNA濃度をそれぞれ算出した。

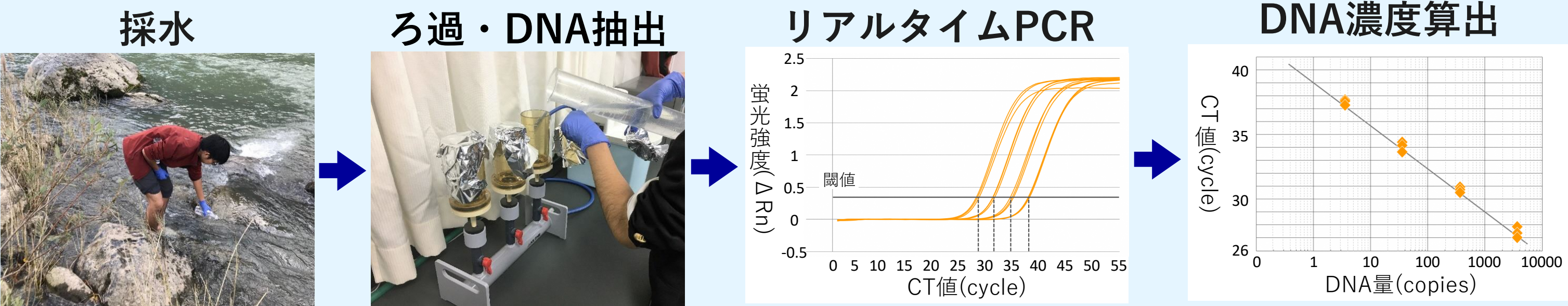


図5 環境DNA調査の流れ



図12 冷水病感染個体

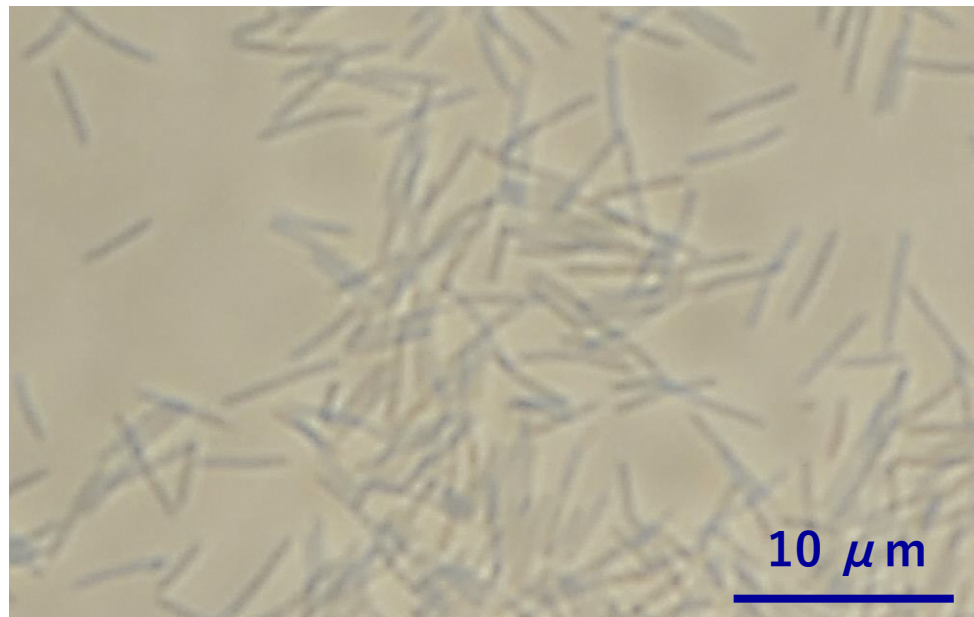


図13 冷水病菌
写真提供：岐阜県水産研究所

Ⅳ. 河川全域における通年の冷水病菌の環境DNA調査

2017年7月から2018年9月までの約1年間、長良川10地点、揖斐川7地点、河口1地点の計18地点で河川水を1 L採取し、ろ過とDNA抽出を行った。その後、リアルタイムPCRを用いた定量解析により河川水1 Lあたりの冷水病菌の環境DNA濃度を算出した。解析には大原らのプライマー⁷⁾と、本研究で設計したプローブを用いて、環境水1 L中の冷水病菌の環境DNA濃度を算出した。

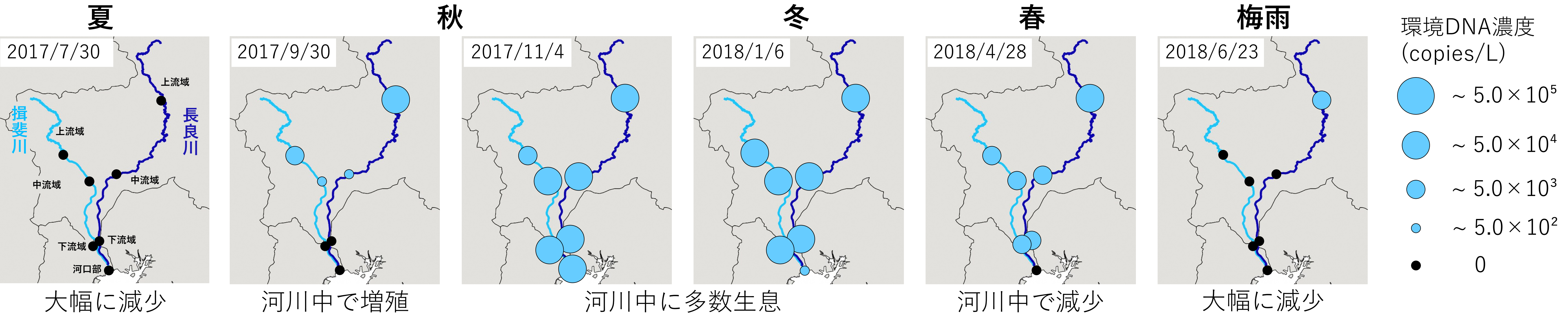


図14 河川全域における冷水病菌環境DNA濃度の季節変動

結果Ⅳ

- ・冷水病菌はアユが河川に生息していない冬の低水温時に多く
- ・アユが河川に生息している夏の高温時には少ない
- ・秋の降下期、春の遡上期にアユと冷水病菌のDNAを同時に検出

結論

- ・冷水病菌はアユの生物量に依存せず、水温に依存して増減する
- ・降下期と遡上期にアユへの冷水病感染が起こりやすい

Ⅴ. 遡上アユの冷水病菌保菌調査

2019年4月2日、4月22日、5月13日に長良川河口堰管理事務所の協力のもと、河口部で遡上アユを採集した。また、2019年6月22日に長良川中流域でも遡上アユを採集した。その後、PCR法を用いて採集したアユのエラと腎臓から冷水病菌DNAの検出を試みた。

日付	エラ	腎臓
2019/4/2	6 (9)	—
2019/4/22	9 (10)	5 (6)
2019/5/13	10 (10)	4 (6)
2019/6/22	12 (13)	—

図16 冷水病菌検査結果
数値：保菌個体数（解析個体数）

結果Ⅴ 流行期以前にアユが冷水病菌を保菌

結論

アユは流行期以前の降下期、遡上期に感染し、梅雨に発症することで、冷水病の流行が起こる

冷水病対策に向けた提案

岐阜県では春の4月上旬から、アユの資源量回復や、漁協組合の遊漁料徴収のためにアユの放流事業が実施されている⁸⁾。

結果Ⅳ・Ⅴのまとめ

4月上旬のアユ放流時には多数の冷水病菌が河川に生息
5月以降は河川水中の冷水菌が減少

結論

放流延期により、放流アユの冷水病感染を防ぎ、冷水病の被害を軽減できる

謝辞

神戸大学准教授 源利文氏、神戸大学 徐寿明氏、岐阜県水産研究所専門研究員 大原健一氏、岐阜大学准教授 向井貴彦氏、世界淡水魚園水族館アクア・トトぎふ 田上正隆氏、岐阜大学教授 古屋康則氏、岐阜大学准教授 原田守啓氏、九州大学 菅野一輝氏、たかはし河川生物調査事務所 高橋勇夫氏、岐阜県土木整備部河川課の皆様、国土交通省中部地方整備局木曽川上流河川事務所の皆様、独立行政法人水産資源機構 長良川河口堰管理所の皆様、郡上漁業協同組合の皆様、長良川中央漁業協同組合の皆様、長良川漁業協同組合の皆様など、多くの方々に支えられ本研究を行うことができました。ここに感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 内山リゅう(2015)『日本の淡水魚』,山と溪谷社
- 2)岐阜県農政部農政課水産振興室(2015)『岐阜県の水産業』
- 3)古屋康則(2010)『河口堰がアユの生活史に与える影響』,長良川下流域生物調査報告書
- 4)高原輝彦ら(2016)『環境DNA分析の手法開発の現状～淡水域の研究事例を中心に～』,日本生態学会誌
- 5)農林水産省アユ冷水病対策協議会(2008)『アユ冷水病対策協議会取りまとめ』
- 6) H. Yamanaka, T. Minamoto (2016) 『The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity』, Ecological Indicators, 47-153
- 7) 大原健一ら(2009)『リアルタイム PCR を用いたアユ冷水病魚における *Flavobacterium psychrophilum* の定量的検出』,日本水産学会誌
- 8) 国立研究開発法人水産研究・教育機構(2018)『交付金課題アユ放流マニュアル』

展望

- ・長良川・揖斐川におけるアユの分布・資源量のモニタリングを長期的に継続し、岐阜県の水産業を支えるアユの水産資源管理に貢献する。
- ・アユ以外の生物種を対象にして、環境DNA調査による生物行動モニタリングを実施し、その有効性を検証する。
- ・環境DNA調査と並行して冷水病菌の保菌調査を毎年実施することで、アユの冷水病感染時期と発症時期、流行時期を把握しアユと冷水病菌の相互関係をより詳しく把握する。
- ・地元漁協などと協力し、アユの放流延期による冷水病被害の軽減効果について検討する。
- ・冷水病菌のような目に見えない外来性細菌の侵入、定着を防ぐために、環境DNA調査によるモニタリングを実施し、河川の生態系の保全に貢献する。
- ・長良川と揖斐川に生息するカジカなどの希少種について環境DNA調査を実施し、それらの分布と生物量を把握することで、河川の生態系保全に貢献する。