

課題番号	1.-(4)	事業実施期間	平成31年度
課題名	鹿児島県内河川におけるニホンウナギの移動状況等の把握		
主担当者	眞鍋美幸（鹿児島県水産技術開発センター）		
分担者	吉満 敏・猪狩忠光・市来拓海（鹿児島県水産技術開発センター）		

### 平成31年度の成果の要約：

1. 鹿児島市八幡川において、電気ショッカーによりニホンウナギを採捕・標識放流した。

Jolly-Seber 法による調査区間の推定生息数は、令和元年10月時点で293尾（4.1尾/100㎡）と推定された。

再採捕された123尾のうち、初回放流日から最終採捕日まで100日以上経過した個体101尾の体重の瞬間成長率（SGR（%/day））の平均値は0.11であった。

調査区別の環境収容力を検討するため、成長と密度の関係を解析したところ、St.6やSt.16等では他の調査区より成長が良く環境収容力に余裕がある可能性が示唆された。一方St.4、St.5は密度が高く成長が悪いので環境収容力に余裕が少ないと推定された。

2. 枕崎市花渡川および支流中州川において、竹筒及び石倉によりニホンウナギを採捕・放流した。

過去に放流した養殖ウナギと天然ウナギの再採捕率について比較したところ、養殖ウナギの一点放流と分散放流に有意な差はみられなかった。また、養殖ウナギと天然ウナギの再採捕率にも有意な差はみられなかった。しかし成長に関しては、H27～H29年に放流した養殖ウナギの体重の瞬間成長率は天然ウナギより有意に低かった。

### 過年度までの成果の概要

1. 鹿児島市八幡川において、電気ショッカーによりニホンウナギを採捕・標識放流し、Jolly-Seber 法による調査区間の生息数を推定した。

これまでに100尾の再採捕個体が確認され、30尾に体重減少がみられたが、これらの大半は再採捕までの期間が短いものであったことから、電気ショッカーや麻酔、標識装着などのハンドリングストレスの影響が考えられた。また、全流程を5m毎に川幅、水深、優占底質、カバー等を調べる環境調査を行ったが、優占底質等の環境要因と採捕尾数の間に相関はみられなかった。

2. 枕崎市花渡川および支流中州川において、竹筒及び石倉によりニホンウナギを採捕・放流し、過去に放流した養殖ウナギの再採捕率や成長について比較したところ、養殖ウナギの一点放流と分散放流、および天然ウナギの再採捕率に有意差はみられなかった。

平成26年7月に放流した50gの養殖ウナギが平成30年11月7日（放流後4年4ヶ月）に再

採捕され 463g に成長し、外見は天然ウナギと見分けがつかなかった。

### 全期間を通じた課題目標及び計画：

鹿児島県内の河川において、ニホンウナギの成長過程に伴う移動状況や生息数を調査することで、河川域でのニホンウナギの季節毎の移動や生息個体数を時系列で把握する。

1. 八幡川におけるニホンウナギの成長過程に伴う移動状況や生息数を調査することで、河川域でのニホンウナギの生息状況に係る知見を収集する。
2. 花渡川で養殖ウナギの放流について効果等を検証し、より効果的な放流手法を検討する。

### 年度別計画

全体計画	H30年度	R1年度	R2年度	R3年度	R4年度
八幡川	環境調査				
	電気ショッカー採捕，標識放流調査				
花渡川	竹筒等採捕，標識放流調査				

### 当該年度計画：

1. 鹿児島市八幡川において、春、夏、秋、冬の年4回、天然のニホンウナギを電気ショッカーで採捕し、標識放流（DNA または PIT タグ標識）を行い、季節毎の移動や生息数を時系列で把握する。

また、推定生息数は Jolly-Seber 法により求め、再採捕個体については成長について調べる。

調査場所は図1のとおり、八幡川の河口から約2km 上流を基点とし、920m の区間を 50m 毎に分け、調査 19 区間（但し終点前の St. 19 は 20m）とする。

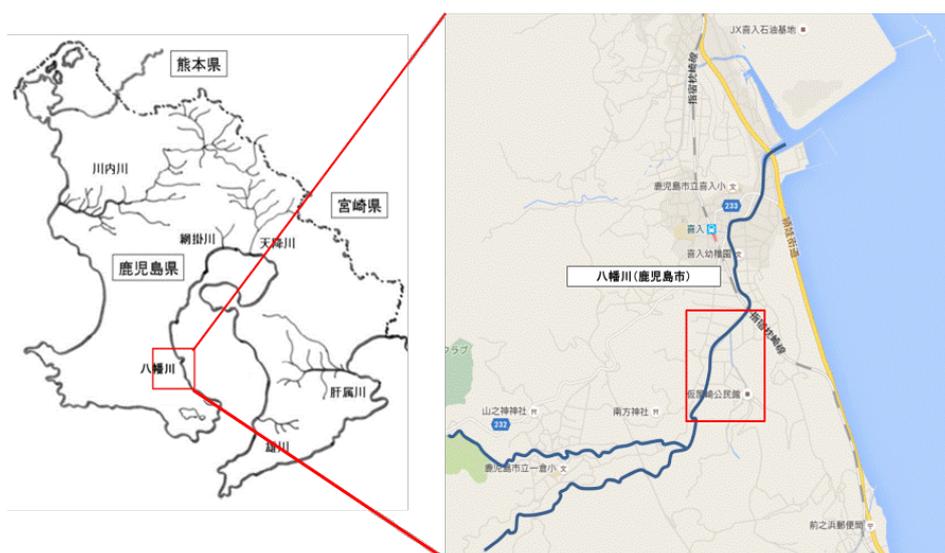


図1 八幡川調査地点

2. 枕崎市花渡川及び中州川において、過去に条件を変えて放流した養殖ウナギを竹筒と小型石倉（毎月1回、周年）及び石倉カゴ（毎月1回、7～12月）で採捕・標識放流（PIT タグ標識）して再採捕率を求め、効果的な放流手法の検討を行う。

調査地点は図2のとおり、花渡川及び支流中州川の河口から上流までの3.5 kmの感潮域に設定したSt.1～St.10の10定点とする。



図2 花渡川、中州川調査地点

結果：

### 1. 八幡川調査

平成31年5月、令和元年7月、10月、令和2年1月の4回調査を行った。

#### 1) 採捕尾数

表1のとおり、令和元年度は延べ126尾、平成27年度からの合計で延べ621尾を採捕した（複数回採捕した個体は複数回で集計）。これまでの調査区間別採捕尾数の合計は図3のとおりで、下流側のSt.4～St.7が40尾以上で多く、特にSt.6は107尾で最多であった。

表1 月別、年度別採捕尾数

		H27年度		H28年度					H29年度					H30年度				R1年度				合計
調査月		12月	5月	6月	8月	10月	1月	5月	6月	8月	10月	12月	4月	7月	10月	1月	5月	7月	10月	1月		
採捕尾数 (尾)	月別	7	29	46	63	35	71	34	23	29	25	30	24	29	17	33	24	38	39	25	621	
	年度別	7	244					141					103				126					

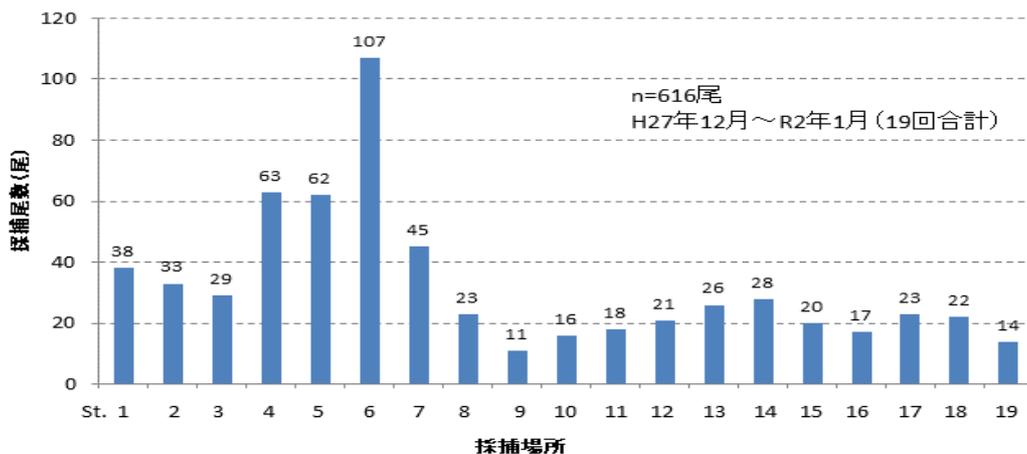


図3 調査区間別の採捕尾数 (19回調査合計)

表2 再採捕尾数

年度	調査日	測定数	うち新規	うち再捕	再捕割合
1	H27 12/16	7	7	0	0.0%
2	H28 5/13	29	29	0	0.0%
3	6/15	46	40	6	13.0%
4	8/8	63	54	9	14.3%
5	10/13	35	22	13	37.1%
6	1/19	71	48	23	32.4%
7	H29 5/23	34	17	17	50.0%
8	6/29	23	16	7	30.4%
9	8/22	29	19	10	34.5%
10	10/11	25	14	11	44.0%
11	12/20	30	14	16	53.3%
12	H30 4/26	24	13	11	45.8%
13	7/2	29	21	8	27.6%
14	10/3	17	12	5	29.4%
15	1/9	33	18	15	45.5%
16	R1 5/8	24	10	14	58.3%
17	7/25	37	21	16	43.2%
18	10/9	39	26	13	33.3%
19	1/15	25	15	10	40.0%
計		620	416	204	32.9%

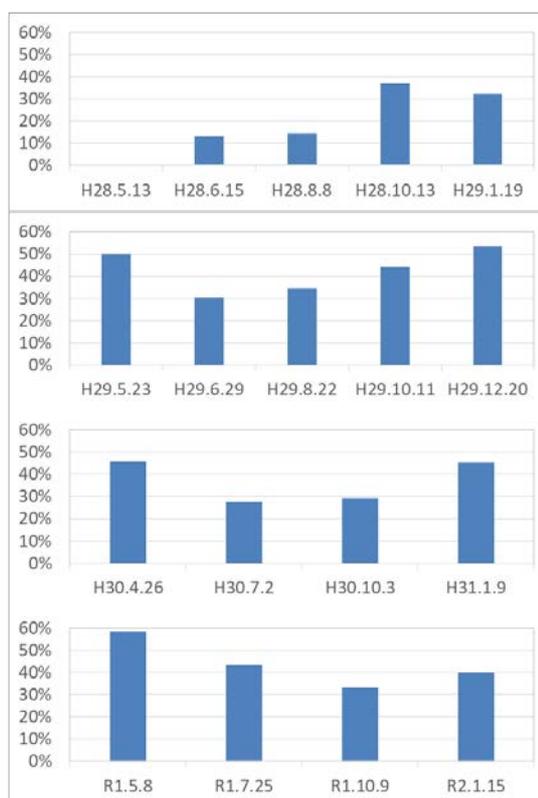


図4 再採捕割合の季節変動

## 2) 再採捕の割合

表2のとおり、平成元年度の再採捕割合は33.3%~58.3%で推移し、全調査の平均は32.9%であった。

図4のとおり、年度別の再採捕割合の季節変動は、放流尾数が少なかった平成28年度を除くと、春季(4~5月)はいずれも50%程度と高く、夏季(7~8月)、秋季(10月)に30%程度に下がり、冬季(12~1月)に再び40%以上に高くなる傾向がみられた。

### 3) Jolly-Seber 法による生息数推定

表3のとおり、Jolly-Seber 法による平成28年以降の全調査区間（総面積7,060 m<sup>2</sup>）におけるニホンウナギの推定生息数は87尾～728尾、平均324尾で、100 m<sup>2</sup>あたりの密度に換算すると1.2尾～10.3尾、平均4.6尾であった。なお、直近の令和元年10月現在では293尾（4.1尾/100 m<sup>2</sup>）と推定された。

表3 Jolly-Seber 法による推定生息数と100 m<sup>2</sup>あたりの推定密度

調査年度	H28					H29					H30				R1			平均
	5月	6月	8月	10月	1月	5月	6月	8月	10月	12月	4月	7月	10月	1月	5月	7月	10月	
推定尾数(尾)	87	260	273	265	289	332	687	286	157	352	157	389	363	728	216	368	293	324
推定密度 尾/100m <sup>2</sup>	1.2	3.7	3.9	3.8	4.1	4.7	9.7	4.1	2.2	5.0	2.2	5.5	5.1	10.3	3.1	5.2	4.1	4.6

### 4) 再採捕個体の移動状況

採捕された616尾のうち、PITタグ標識またはDNA標識により、1回以上の再採捕が確認された個体122尾（2回以上再採捕された個体も1尾とする）について、初回放流地点から最終採捕地点までの移動距離を図5に、移動状況を図6～8に示す。

放流地点から下流側へ550m～上流側に350mの範囲内で移動し、50m以上下流に移動していた個体は25尾、上下50mの範囲内にとどまっていた個体は66尾、50m以上上流に移動していた個体は31尾であった。

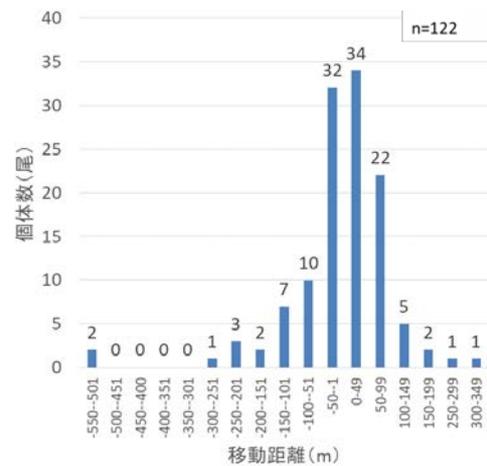


図5 再採捕個体の移動

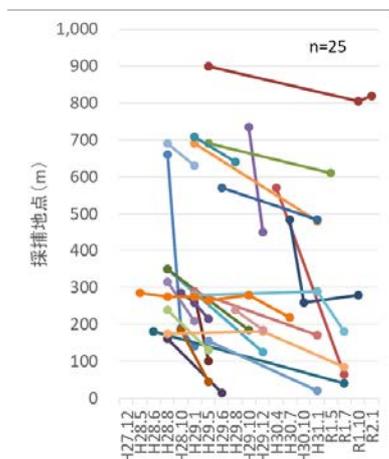


図6 個体別の移動状況  
(50m以上下流へ移動)

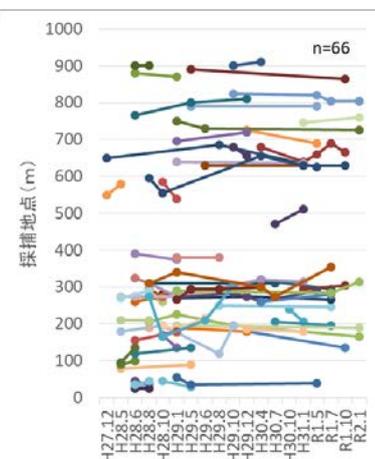


図7 個体別の移動状況  
(上下50m以内に定住)

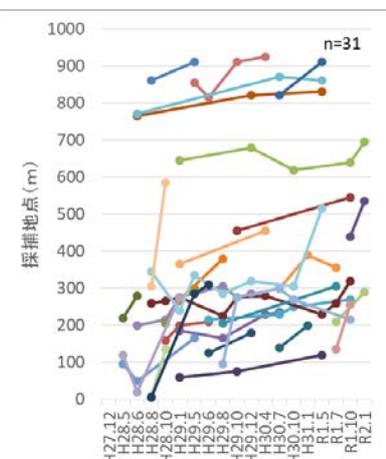


図8 個体別の移動状況  
(50m以上上流に移動)

### 5) 再採捕個体の成長

再採捕が確認された個体 122 尾（2 回以上再採捕された個体も 1 尾とする）のうち、最終採捕時に体重が増加した個体は 97 尾、減少した個体は 25 尾であった。

最終採捕時の体重が 100g 未満の小型個体の体重変化を図 9 に、100g 以上の大型個体の体重変化を図 10 に示す。

再採捕までの期間が短い個体は体重が減少しているものが多く、電気ショッカーや麻酔、標識装着等によるハンドリングストレスによる一時的な減少と推察された。なお、短期間では減少した個体も以後回復し、長期間を経た後に再採捕された個体は増加しているものが大半を占めた。

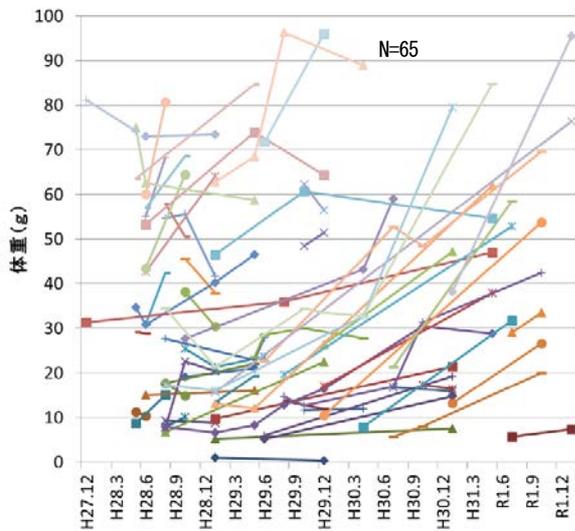


図 9 再採捕個体の体重変化（100g 未満）

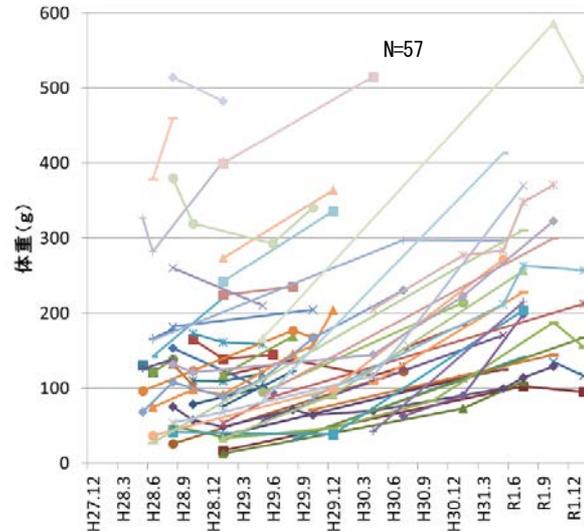


図 10 再採捕個体の体重変化（100g 以上）

### 6) 再採捕個体の瞬間成長率

全長の瞬間成長率 Specific Growth Rate (SGR (%/day)) =  $100 \times (\ln(L2) - \ln(L1)) / T$   
 L1：放流時全長 (mm) L2：再採捕時全長 (mm) T：再採捕までの期間 (日) を算出し、その頻度を図 11 に示した。全長 SGR の最頻値は、0~0.05% で、全個体の平均値は 0.037% であった。

同様に体重の SGR (%/day) =  $100 \times (\ln(W2) - \ln(W1)) / T$  W1：放流時体重 (g) W2：再採捕時体重 (g) T：再採捕までの期間 (日) を算出し、その頻度を図 12 に示した。体重 SGR の最頻値は、0.1~0.2% で、全個体の平均値は 0.108%、ハンドリングの影響を緩和するため、初回放流日から最終採捕日まで 100 日未満の個体を除く 101 尾の平均値は 0.116% であった。後述す

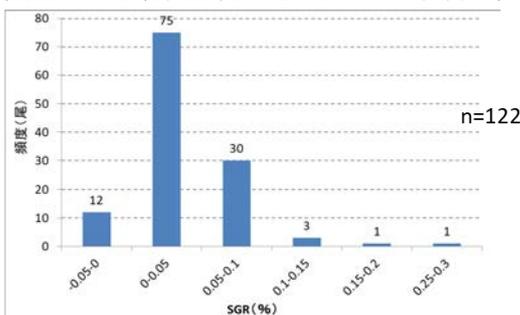


図 11 再採捕個体の全長 SGR

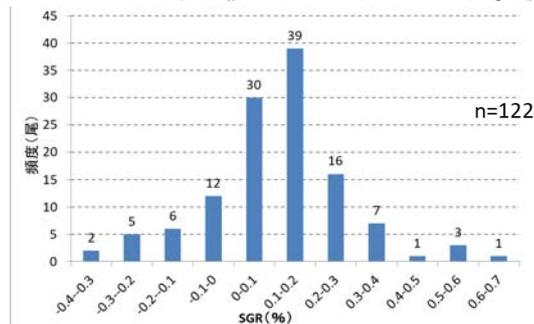


図 12 再採捕個体の体重 SGR

る枕崎市花渡川の天然個体の平均値は 0.17 であり、花渡川よりも成長が若干遅い事がわかった。

### 7) 再採捕個体の日間成長量

全長の日間成長量 Growth Rate ( GR (g/day) = (L2-L1) /T L1 : 放流時全長 (mm) L2 : 再採捕時全長 (mm) T : 再採捕までの期間 (日) を算出し、その頻度を図 13 に示した。全長 GR の最頻値は、0~0.1mm で、全個体の平均値は 0.126mm であった。

体重の日間成長量 GR (g/day) = (W2-W1) /T W1 : 放流時体重 (g) W2 : 再採捕時体重 (g) T : 再採捕までの期間 (日) を算出し、その頻度を図 14 に示した。体重 GR の最頻値は、0~0.1g で、全個体の平均値は 0.093g だった。

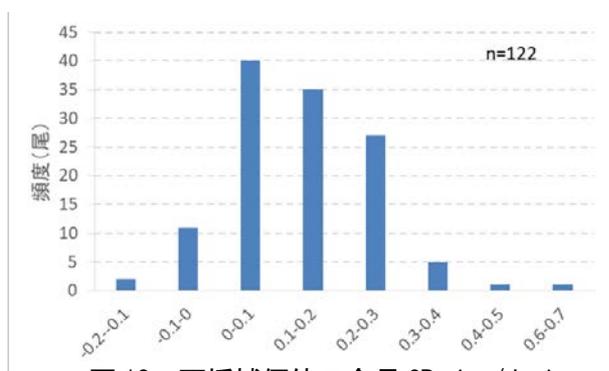


図 13 再採捕個体の全長 GR (mm/day)

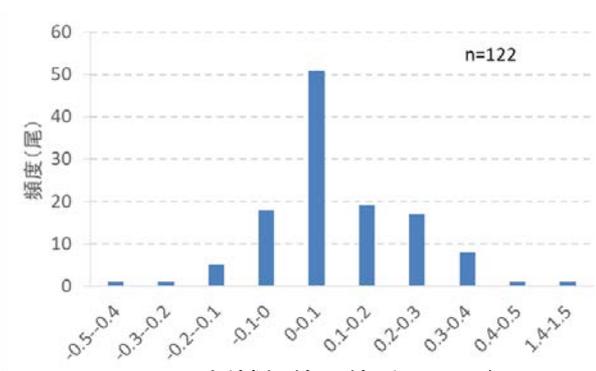


図 14 再採捕個体の体重 GR (g/day)

### 8) 調査区別の環境収容力の検討

各 St. の環境収容力を検討するため、St. 別の成長と密度の関係を図 15 に示す。成長は St. 別の体重 SGR の平均 (放流日から最終採捕日まで 100 日未満の個体を除く)、密度は 1 回あたり・100 m<sup>2</sup>あたりの採捕数とした。

St. 16、St. 3、St. 8 は、密度が低く成長が良いので、環境収容力に余裕がある可能性が示唆された。また St. 6 は、密度は高いが成長は良いので、環境収容力に余裕がある可能性が示唆された。一方 St. 4、St. 5 は、密度が高く成長が悪いので環境収容力に余裕が少ないと推察された。

なお、St. 9 は再採捕個体が無く、St. 12 は放流から 100 日以上経過した再採捕個体が 1 個体のみであったため、更なるデータの蓄積による精度の向上が必要である。

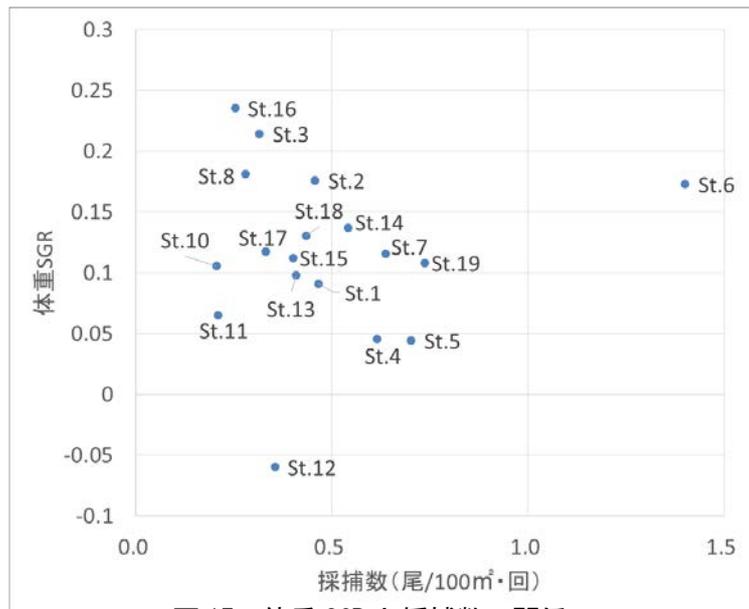


図 15 体重 SGR と採捕数の関係

## 2. 花渡川、中州川調査

これまでに養殖放流ウナギ 50g サイズは 200g サイズより再採捕率が有意に高く、200g サイズで越冬後に再採捕されたものは 1 例のみであったことから、以後の報告は養殖放流ウナギ 50g サイズのみについて検証した。

### 1) 再採捕率等

令和 2 年 1 月末現在の放流尾数、再採捕尾数、再採捕率、放流手法について養殖ウナギを表 4 に、天然ウナギを表 5 に示した。なお、再採捕個体については、放流直後に滞留した個体の再採捕を除外するために、100 日以上経過して再採捕されたものを抽出し、2 回以上再採捕された個体も 1 尾として計算した。

St. 8 で一点放流を行った平成 26 年度放流群が 4.3%、平成 27 年度放流群が 7.2%に対し、10カ所に分散放流した平成 28 年度放流群が 8.9%、平成 29 年度放流群が 5.0%であり、養殖ウナギの一点放流と分散放流の再採捕率に有意差はみられなかった (Steel-Dwass 法)。

また、平成 27 年度以降の天然ウナギ放流群の再採捕率は 8.7%であり、養殖ウナギと天然ウナギの再採捕率にも有意差がみられなかった (Steel-Dwass 法)。

表 4 養殖ウナギ 50g サイズ (令和 2 年 1 月末現在) 100 日以上

年度	放流尾数 (尾)	再採捕尾数 (尾)	再採捕率 (%)	放流手法
H26	399	17	4.3	一点 (St.8)
H27	345	25	7.2	
H28	700	62	8.9	分散 (10カ所)
H29	700	35	5.0	
養殖合計	2,144	139	6.5	

表 5 天然ウナギ (令和 2 年 1 月末現在) 100 日以上

	放流尾数 (尾)	再採捕尾数 (尾)	再採捕率 (%)	放流手法
天然	1,133	99	8.7	分散 (採捕場所)

### 2) 再採捕時の体重変化

#### ①平成 26 年度放流養殖ウナギ 50g サイズ

平成 26 年 7 月に St. 8 で一点放流した養殖ウナギ 50g サイズ 399 尾のうち 35 尾が再採捕された (図 16)。なお、同じ個体が複数回再採捕された場合、再採捕回数として (44 回) と記載した (以下の放流群も同じ記載)。

放流後、翌年の 4 月頃までに再採捕された個体の体重は減少、または横ばいであったが、平成 27 年 7 月以降に再採捕された個体はすべて増加していた。なお、今年度に新たに再採捕された平成 26 年度放流個体はなかった。

最大個体は平成 30 年 11 月 7 日（放流後 4 年 4 ヶ月）に再採捕された No. 5550 の体重 463g で、この時の全長は 691mm、色調や体型からは天然の黄ウナギと区別できなかった。この個体は、昨年度に引き続き、花渡川で再採捕された養殖ウナギの中で過去最大であり、今年度はこの個体より大きな放流養殖ウナギは再採捕されなかった。

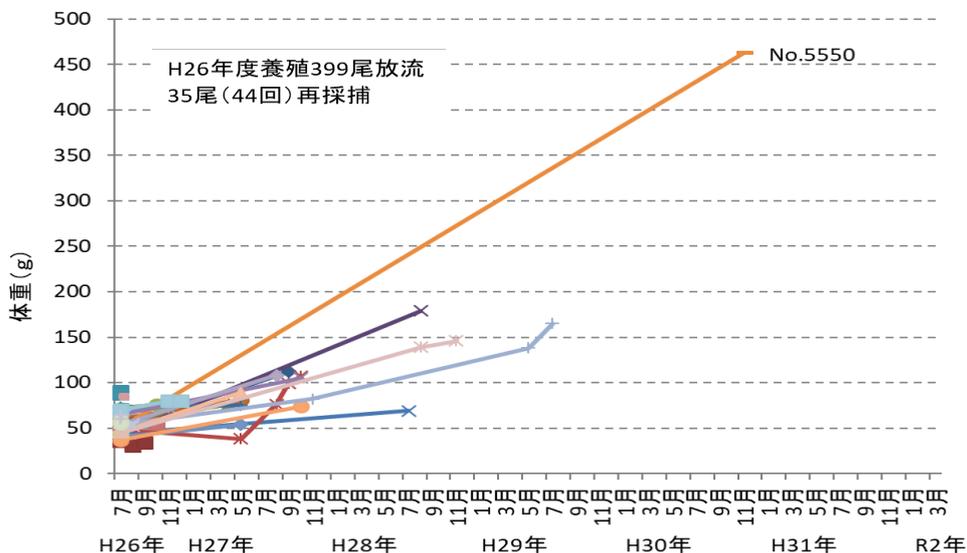


図 16 平成 26 年度養殖ウナギ再採捕時の体重

②平成 27 年度放流養殖ウナギ 50g サイズ

平成 27 年 7 月に St. 8 で一点放流した養殖ウナギ 345 尾のうち 31 尾が 47 回再採捕された（図 17）。放流後、翌年 5 月までに再採捕された個体の体重は減少、または横ばいが多かったが、翌年 6 月以降に再採捕されたものは増加していた。なお、最大個体は平成 30 年 10 月 5 日（放流後 3 年 3 ヶ月）に、最下流の St. 1 で再採捕された No. 5477 の体重 259g、全長 561mm で、銀化（ステージ S1）しており、50g サイズの養殖放流ウナギで初めて銀化を確認した。

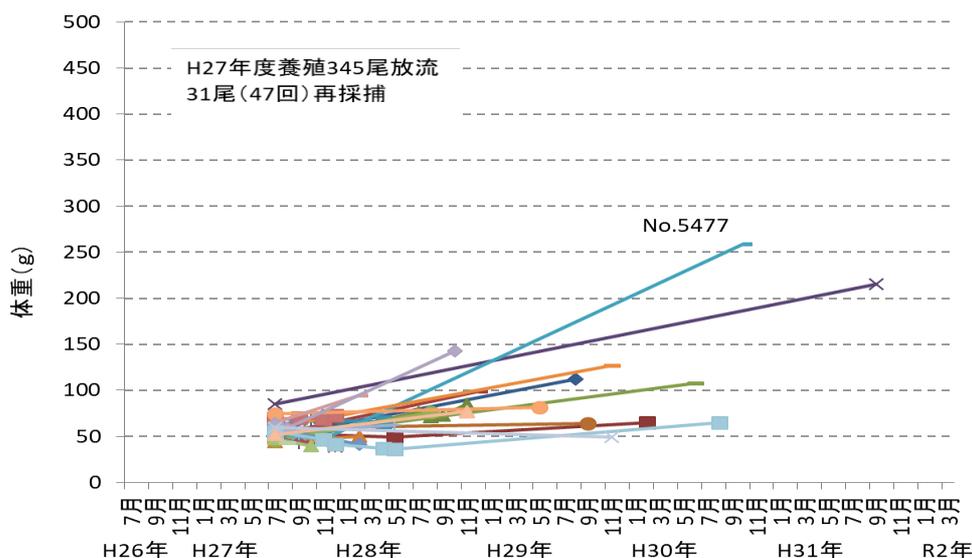


図 17 平成 27 年度養殖ウナギ再採捕時の体重

③平成 28 年度放流養殖ウナギ 50g サイズ

平成 28 年 7 月に 10 カ所に分散放流した養殖ウナギ 700 尾のうち 90 尾が 122 回再採捕された (図 18)。放流後、年内に再採捕された個体の体重は、減少または、横ばいが多かったが、翌年 5 月以降は増加している個体が多くみられた。なお、最大は令和元年 6 月 18 日 (放流後 2 年 11 ヶ月) に再採捕された No. 5658 の体重 231g、全長 549mm であった。

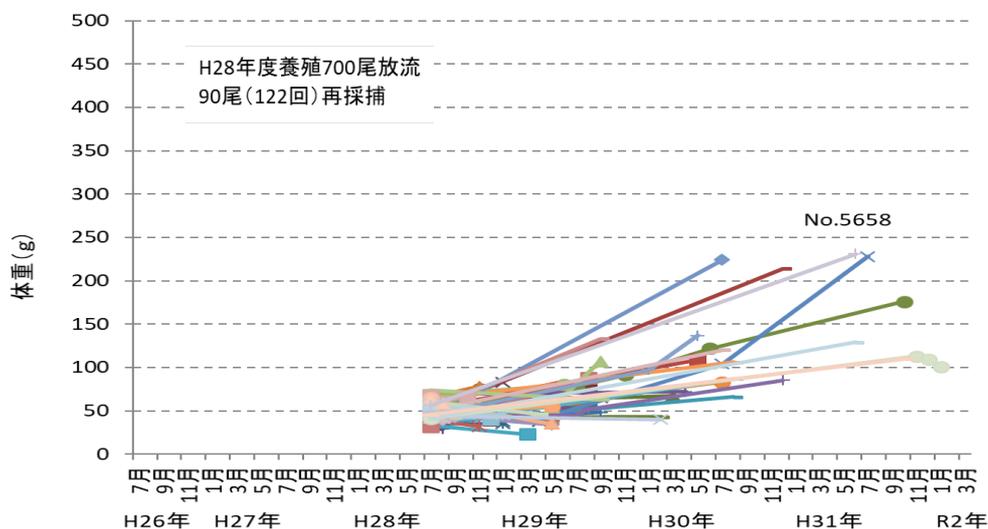


図 18 平成 28 年度養殖ウナギ再採捕時の体重

④平成 29 年度放流養殖ウナギ 50g サイズ

平成 29 年 7 月に 10 カ所に分散放流した養殖ウナギ 700 尾のうち 52 尾が 63 回再採捕された (図 19)。放流後翌年夏前までの体重は減少傾向であったが、その後に再採捕されたものは増加していた。なお、最大は令和元年 9 月 12 日 (放流後 2 年 2 ヶ月) に再採捕された No. 5769 の体重 159g、全長 484mm であった。

放流後短期間では体重が減少する個体が多いことは、過去の傾向と同じであった。

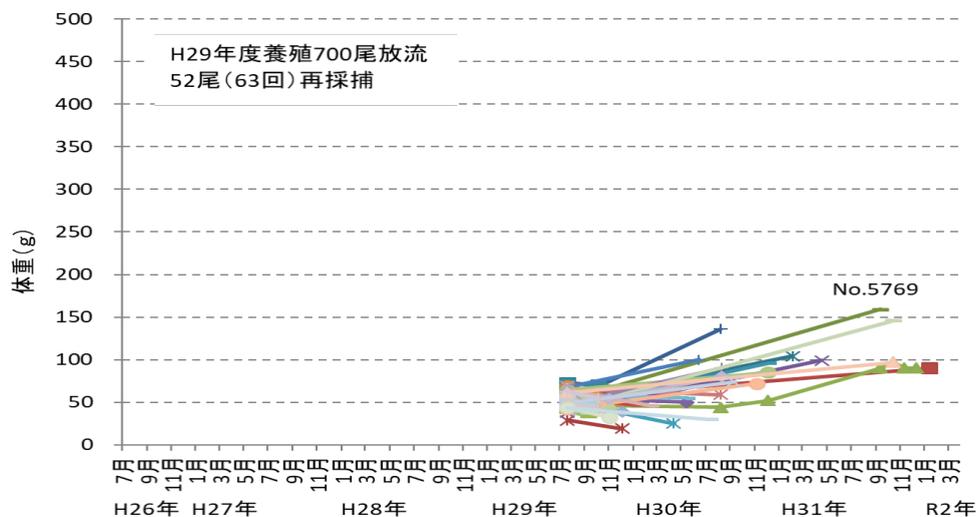


図 19 平成 29 年度養殖ウナギ再採捕時の体重

### ⑤天然ウナギ

平成27年5月から令和21年1月までに、天然ウナギ1,133尾を放流し、169尾が431回再採捕された(図20)。再採捕時より体重が減少したものは7個体で、その他は全て、横ばいまたは、増加していた。なお、最大は令和元年7月18日(放流後3年8ヶ月)に再採捕したNo.5674の体重630g、全長707mmであった。また、7月~12月に実施した石倉調査で毎月必ず再採捕された個体があり、過去の採捕と合わせて最多の15回採捕となった。

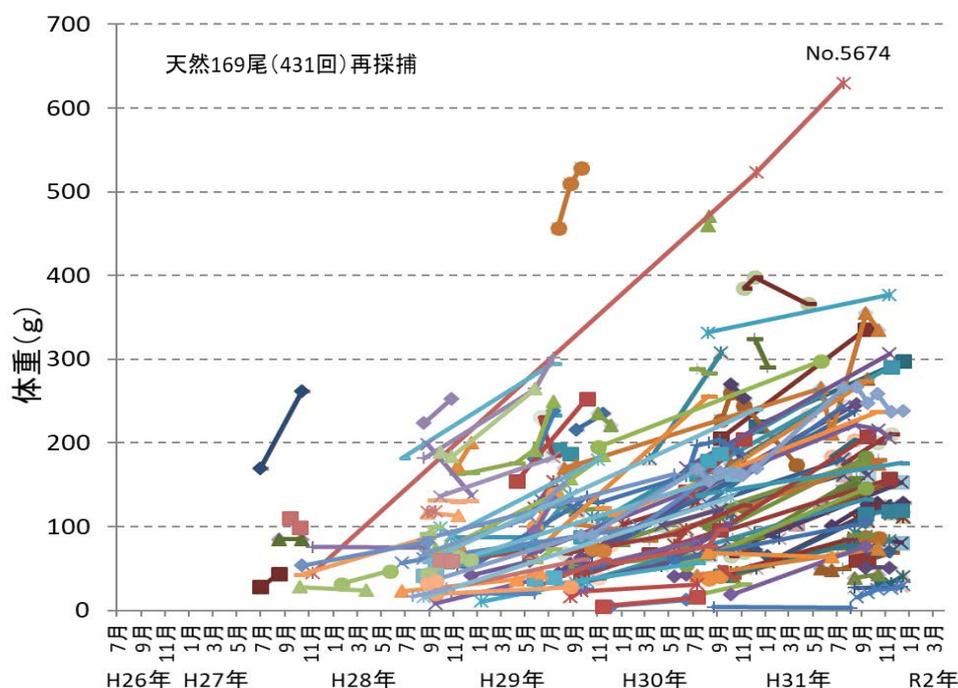


図20 天然ウナギ再採捕時の体重

### 3) 各放流群における最大再採捕個体の瞬間成長率

表6に再採捕までに100日以上経過した個体の体重SGRをまとめたところ、天然ウナギ99尾の平均SGRは0.17%、養殖放流ウナギH26年の17尾が0.14%、H27年の25尾が0.05%、H28年の62尾が0.04%、H29年の35尾が0.00%でありH27~H29年の養殖ウナギは天然ウナギより有意に成長が遅かった。

先に2)で述べた各放流群の最大個体について、放流、再採捕時における全長、体重、肥満度及び経過日数、体重における瞬間成長率(SGR%)を表7にまとめた。養殖ウナギの初回放流時の体重は51g~56gで、H26、H27、H28の養殖ウナギの肥満度は放流時には1.0以下であったが、再採捕時には1.40~1.47まで増加していた。

なお、天然ウナギ最大個体のSGRは0.20%、養殖放流ウナギ最大個体のSGRは平成26年度が0.14%、平成27年度が0.14%、平成28年度が0.13%、平成29年度が0.14%で、各放流群の最大個体を比較しても養殖ウナギは天然ウナギより成長が遅かった。

表6 100日以上経過した

区分	対象個体数(尾)	平均SGR(%) (体重)
天然	99	0.17
H26	17	0.14
H27	25	0.05
H28	62	0.04
H29	35	0.00

表7 最大個体の瞬間成長率

区分	放流年月 再採捕年月	全長 (mm)	体重 (g)	肥満度	経過日 数(日)	体重の SGR (%)
天然	H27.11	335	45	1.20	1,346	0.20
	R1.7	707	630	1.78		
H26	H26.7	375	51	0.96	1,569	0.14
	H30.11	691	463	1.40		
H27	H27.7	382	54	0.97	1,164	0.14
	H30.10	561	259	1.47		
H28	H28.7	402	56	0.87	1,069	0.13
	R1.6	549	231	1.40		
H29	H29.7	349	53	1.24	783	0.14
	R1.9	484	159	1.40		

4)天然ウナギと養殖ウナギの採捕尾数の推移

竹筒による天然ウナギと養殖ウナギの採捕尾数を図21に示す。

竹筒の占有率(採捕尾数の割合)の6年間の合計は、養殖ウナギが17.9%、天然ウナギが82.1%であった。平成29年度までは8~9月に養殖ウナギの採捕尾数が多くなっているが、毎年7月に養殖ウナギを約350尾~700尾放流していることから一時的な滞留によるものと考えられた。

平成30年度以降は、簡易魚道調査のため、支流の中州川に養殖ウナギ50gサイズを平成30年度118尾、令和元年度117尾標識放流しているが、本流花渡川で放流をしていないため、養殖ウナギの占有率が徐々に減少している。

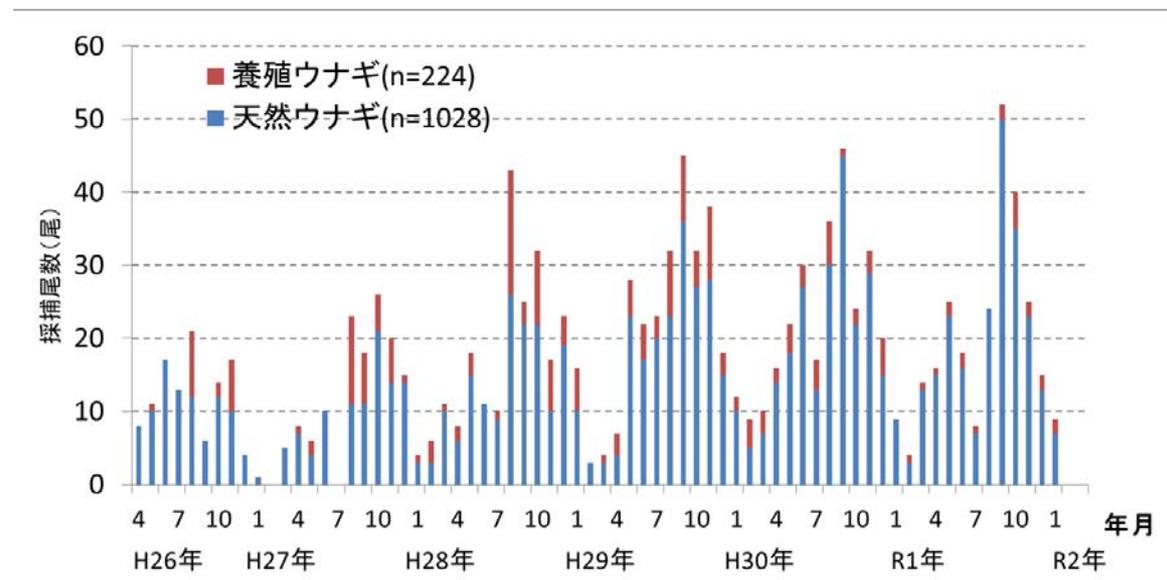


図21 竹筒による天然ウナギと養殖ウナギの採捕尾数の推移

#### 課題と対応策：

26年度放流群の今年度の再採補はなく、平成27年度放流群は1尾のみであり、放流後5年程度経つと追跡が困難になってきた。川の規模に対し、放流数が少なかった可能性も考えられる。

花渡川では、竹筒のロープが切られ、6セット中5セットが何者かに持ち去られたり、石倉カゴのロープが切られ塩ビパイプが持ち去られる被害が発生した。このため、「鹿児島県調査中」の札を漁具に取り付けるようにしたところ、その後被害は発生していない。

また、調査用竹筒の周囲に遊漁者のものと思われる竹筒が多数仕掛けられるようになり、放流ウナギが漁獲されていると思われる。本県では親ウナギを保護するため調整委員会指示で10月から2月まで全面禁漁となっているため、枕崎市に依頼して市広報で市民に啓発していたが、3月から9月までは自由であり対応に苦慮している。

課題番号	2.-(1)	事業実施期間	平成31年度
課題名	環境DNAによるニホンウナギの在・不在検出技術の実証開発		
担当者	山本祥一郎（国立研究開発法人 水産研究・教育機構）		
分担者	山本敏博・關野正志・安池元重・馬久地みゆき・本郷悠貴・矢田 崇(国立研究開発法人 水産研究・教育機構)・井上幹生・畑 啓生・三宅 洋（国立大学法人 愛媛大学）		

### 平成31年度の成果の要約：

室内実験において、体サイズの大きな個体ほど環境中に放出する環境DNA量が多くなることを示した。ただし、環境DNA濃度の個体差が大きく、環境中に放出されるDNA量は体サイズだけでなく、個体の活動性（代謝）とも関係すると考えられた。和歌山県高瀬川において実施した野外調査では、環境DNA濃度に流程に沿った増減傾向は認められなかった。また、調査地点毎のニホンウナギのバイオマスと環境DNA濃度との関係は不明瞭であった。

### 過年度までの成果の概要

環境水からニホンウナギ環境DNAを検出する実験手法を確立させた。実験の手順は以下の通りである。採水検体（1L）を、電動ポンプを用いてガラスフィルター（ワットマン社 GF/F フィルター 47 mm）上に濾過した。さらに、DNAの保存状態を高めるために、100%エタノール15mlをフィルター上に添加し(Minamoto et al., 2016)、目視によりフィルターの乾燥が認められるまで吸引濾過を続けた。濾過後のフィルターは、直ちに-20℃で冷凍保存した。フィルターからのトータルDNA抽出は、Miya et al. (2015)の方法に従い、Qiagen社のDNeasy Blood & Tissue Kitを用いて最終収量が200µlになるように抽出した。環境DNAの検出・定量化には、ロシュ社LightCycler480機器を用いてリアルタイムPCRにより分析した。リアルタイムPCR反応には、ミトコンドリアDNA(16S ribosomalRNA)に設計されたニホンウナギを特異的に検出するプライマーおよび蛍光プローブ(蛍光色素:FAM)を用いて (Minegishi et al., 2009)、アニーリング温度60℃で反応させた。中央水産研究所日光庁舎・屋内水槽にて畜養しているニホンウナギの飼育水を用いてPCR反応をおこなったところ、明瞭な増幅反応を確認することができた。また、DNAコピー数が予めわかっているスタンダードサンプルを用いて作成した検量線と照合させることにより、環境水中に存在するニホンウナギDNAコピー数を定量することが可能となった。

環境水中における環境DNAの分解過程を調べるために、中央水産研究所日光庁舎において以下の室内実験を行った。300Lの円形水槽を4基設置し、恒温器を用いてそれぞれ10℃、15℃、20℃、25℃の水温に設定した。別に用意したニホンウナギ飼育水10Lをそれぞれの円形水槽に移し、経時的に採水し、PCR反応を行った。その結果、環境DNAコピー数は時間とともに有意に減少し、その

減少パターンは指数関数式に適合した。また、ほとんどの実験において、高水温環境下ほど分解速度が速くなる傾向が認められた。環境 DNA コピー数が半数となる日数(半減期)を推定したところ、10℃ではおよそ 2.1~2.2 日、15℃では 1.6~1.9 日、20℃では 1.1 日~1.5 日、25℃では 1.0~1.2 日であった。

ニホンウナギの個体数、バイオマスと環境 DNA 濃度との関係を調べるために、人工河川(流程約 120m、川幅約 1m、流量 0.021m<sup>3</sup>/s)を用いた野外実験をおこなった。その結果、環境 DNA 濃度は、ニホンウナギの尾数およびバイオマスと有意な相関関係を持つことが示された。

#### 全期間を通じた課題目標及び計画：

環境 DNA は、環境中に含まれる DNA のことを指す。近年、環境 DNA 分析は、水生生物の在・不在の検出のみならず、個体数やバイオマス、分布パターンなどを推定する新しい手法としても注目を集めている。本課題では、ニホンウナギの環境収容力を評価する手法開発の一環として環境 DNA 分析の技術開発に取り組む。まず、ニホンウナギを対象とする環境 DNA 分析手法を確立させ、ニホンウナギの在・不在検出への適用について検討する。次に、室内・野外実験を通して、ニホンウナギ環境 DNA の放出・分解過程を把握する。また、野外調査データと組み合わせることにより、河川内における環境 DNA の分布パターンやニホンウナギ生物量と環境 DNA 濃度との関係を調べる。

#### 当該年度計画：

室内および野外実験を行い、ニホンウナギの生物量と環境 DNA 濃度との関係を調べる。河川において環境 DNA の分布パターンを調べる。

#### 結果：

(1) 環境水中における環境 DNA の挙動を調べる研究の一環として、本年度はニホンウナギ個体から環境中に放出される環境 DNA 量を調べる実験に取り組んだ。実験の方法は以下の通りである。中央水産研究所日光庁舎の実験施設内において設置した 300L の円形水槽 3 基を、恒温器を用いて 20℃ の水温に設定した(図 1)。円形水槽内の水は、電動ポンプを使用し常に循環状態を保った。日光庁舎にて畜養しているニホンウナギを全長、体重を記録した後に、それぞれの円形水槽に 1 尾ずつ移し、投入から 1 時間後、2 時間後、3 時間後、5 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後、96 時間後にそれぞれ 1L を採水した。一部の個体については、さらに 168 時間後、192 時間後、216 時間後、240 時間後、264 時間後にも採水した。採水した水は、30 分以内にフィルター濾過を行ない、DNA 抽出までフィルターを冷凍保存した。実験終了後の円形水槽、恒温器については、次亜塩素酸ナトリウムを用いて十分に洗浄した後に、その後の実験に用いた。環境 DNA コピー数の定量については、それぞれの検体についてリアルタイム PCR 反応を 4 回(反復)おこない、1 回の PCR 反応において DNA コピー数が 1 未満であった場合は検出下限値扱いとし、その後の解析から除外した。実験は 16 個体について行い、実験に使用したニホンウナギの全長および体重の範囲はそれぞれ 72mm~537mm、

0.29g~235.57g である。



図1 室内実験に使用した円形水槽

図2に、実験回ごとの環境DNA濃度の推移を示した。いずれの実験回においても、ニホンウナギ投入1時間後に環境DNAが検出された。その後の環境DNA濃度の推移パターンは実験回ごとに異なり、時間経過とともに濃度が上昇し続ける実験もあれば、濃度があるピークに達した後に減少していく実験もみられた。また、濃度が減少し始める時間もそれぞれの実験回で異なり、実験開始から24時間後に減少が観察された実験や、72時間後に減少が確認される実験もあり、個体によって濃度の推移パターンに大きな違いが認められた。これにはニホンウナギの活動性(個体のコンディション)や代謝の個体差が関係していると考えられる。実験水槽内で観察される環境DNA濃度は、ニホンウナギから放出されるDNA量とDNA分解速度の双方が関係すると想定されるが、このうちDNAの分解速度は、水温や環境水中の微生物量などに影響を受けるものの、実験水槽内の環境が一定であれば、実験回ごとに大きく変化するものではない。一方、ニホンウナギから放出されるDNA量は、個体の活動性や代謝の違いに影響を受け、実験に用いた個体毎に大きく異なるものと考えられる。今回の実験では、一部の実験に環境DNA濃度の減少が確認されたが、これは実験水槽に移されたニホンウナギがある時間を経て活動性を低めた結果、体外に放出される環境DNA量が減少し、単位時間あたりの放出量が分解量を下回ったためと推察される。今回実施した全ての実験について、実験開始から24時間以内では環境DNA濃度の明瞭な減少がみられなかった。実験開始24時間後の環境DNA濃度とニホンウナギ体重との関係を見てみると(図3)、個体差は大きいものの、体重が重い個体ほど実験水槽内の環境DNA濃度が高いという関係が認められた( $P < 0.001$ )。このことから、ニホンウナギの環境中へのDNA放出量に、活動性の個体差に加え、個体の体サイズの違いも関係していると考えられた。

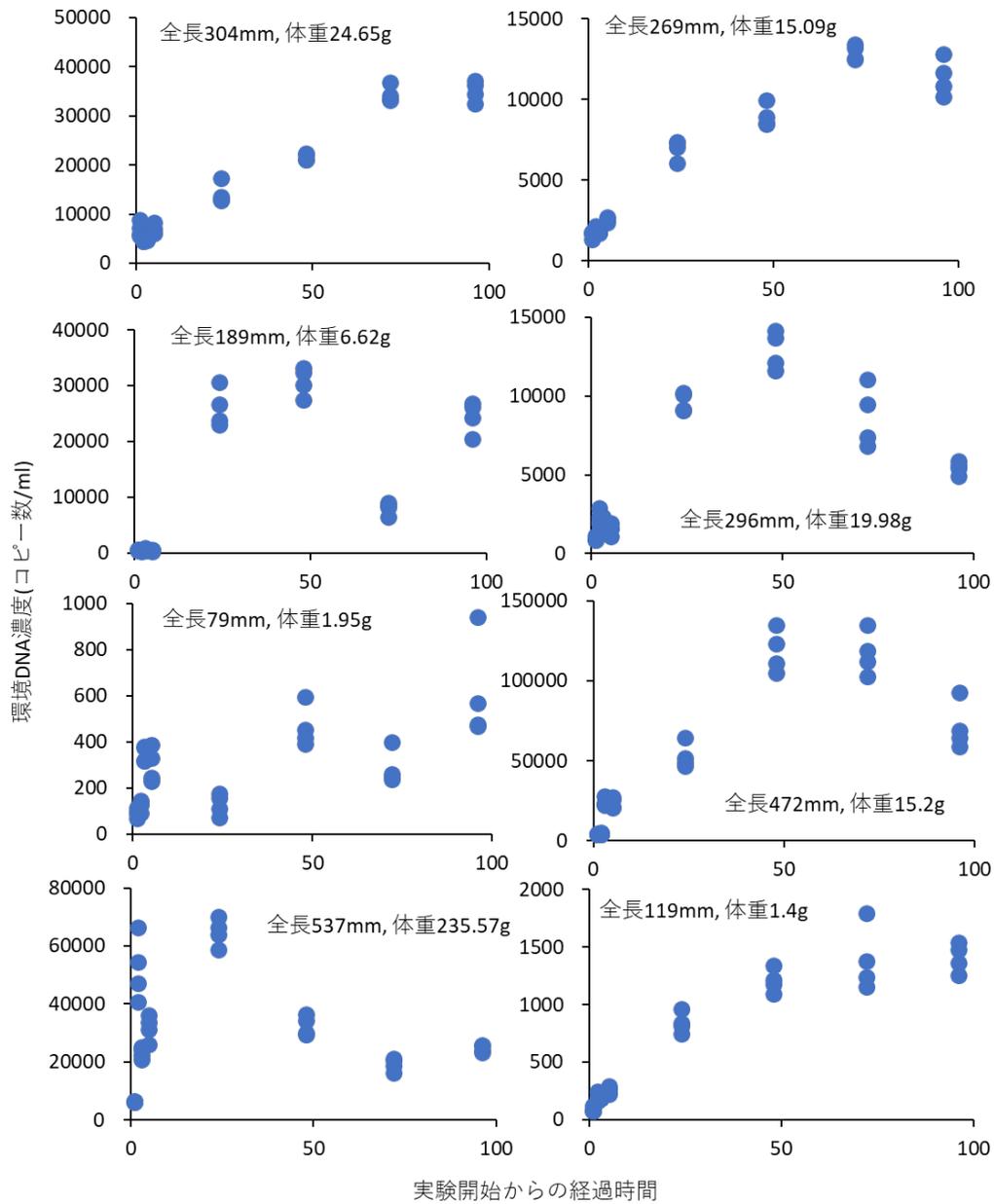


図2 実験回ごとの環境DNA濃度の推移。各実験で、縦軸と横軸の範囲が異なるので注意のこと。

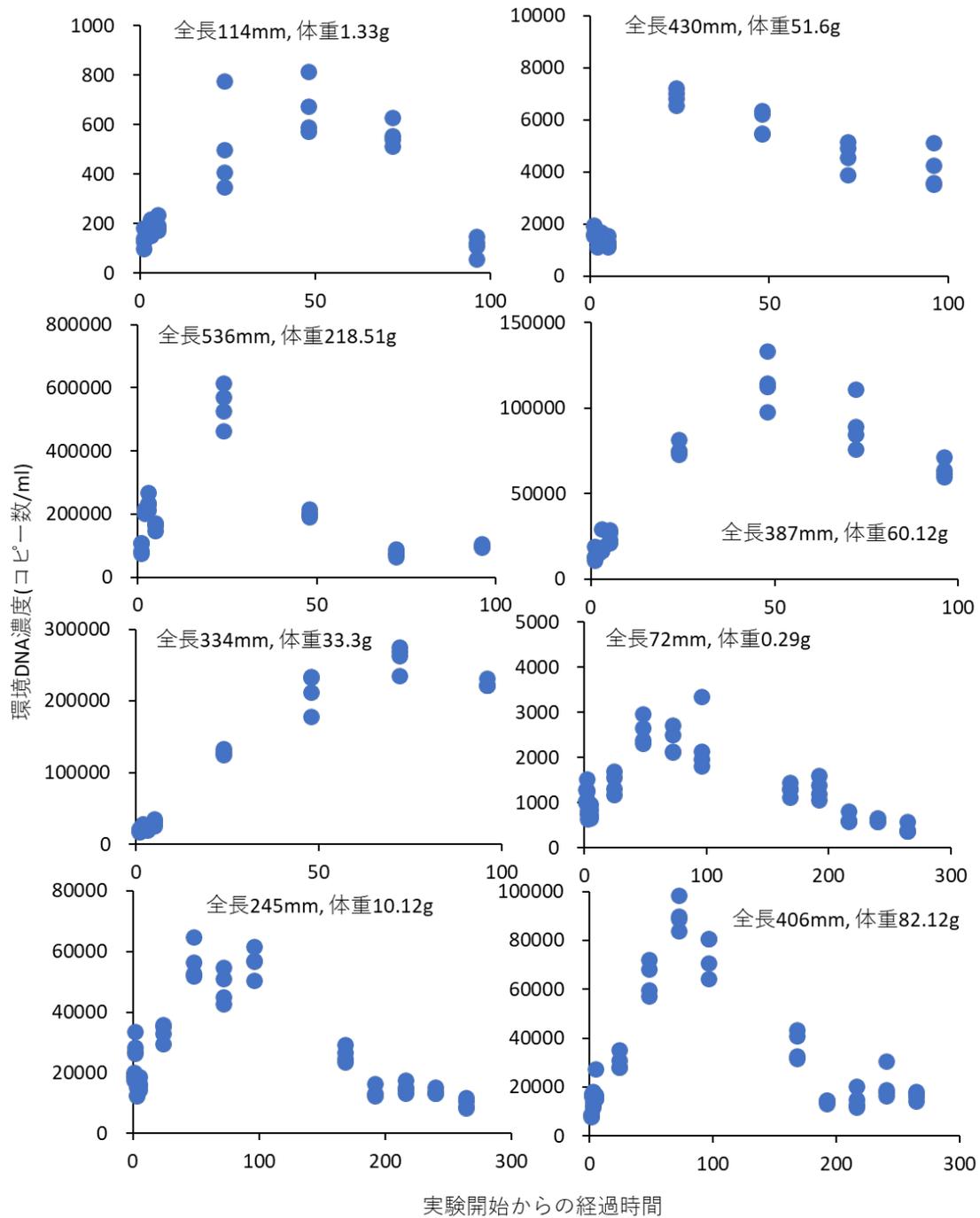


図2 つづき。

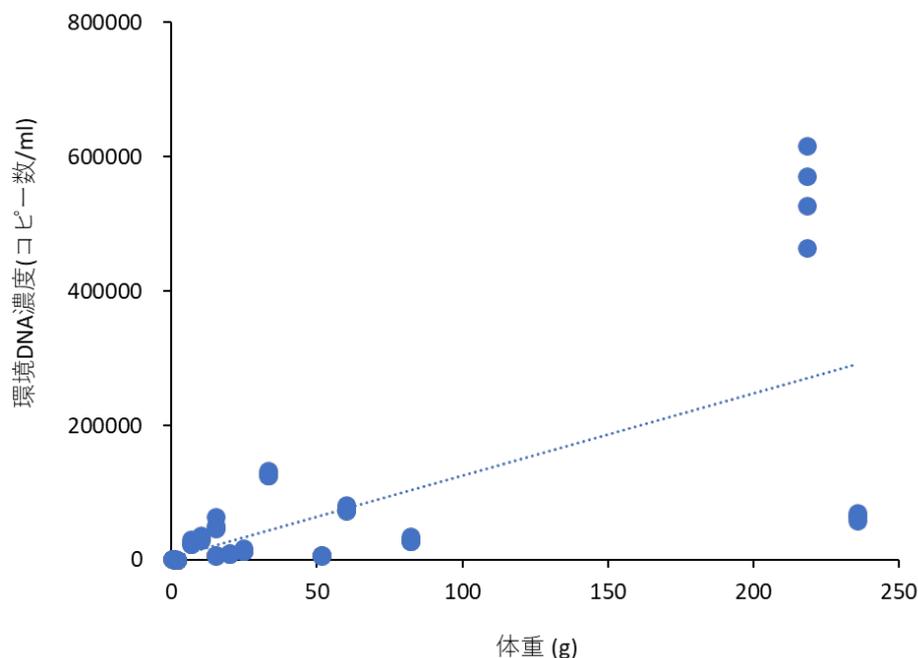


図3 実験開始から24時間後のニホンウナギの体重と環境DNA濃度との関係。

(2) 自然河川における環境DNAの分布パターン、および環境DNA濃度とバイオマスとの関係を調べるために、和歌山県高瀬川において以下の調査を行った。高瀬川の河口から上流方向約1.3km地点に調査地点を設け、さらに上流方向に向かって50m毎に調査区間を設定し、合計18箇所の調査区間を設定した。調査区間の総流程距離は900mとなる。それぞれの調査区間において、その最下流端で表層水を1L採水した。採水にあたっては、河川の横断面に沿って目視によりもっとも流速が早いと想定される場所、その判別が困難な場合は川幅のほぼ中間地点で採水した。採水した水は直ちにフィルター濾過を行い、濾過フィルターをDNA抽出まで冷凍保存した。採水後、和歌山県水産試験場、和歌山県自然博物館と共同して、調査区間に生息するニホンウナギの採捕調査を行った。ニホンウナギの採捕は、電気漁具2台を用い、調査区間の最下流地点から上流方向に向かって河川全体を隈なく採集するようにした。採捕された個体については、採捕地点を記録するとともに、体サイズを計測した。採水調査は2019年11月20日に、ニホンウナギ採捕調査は2019年11月20日-21日にかけて実施した。

図4に、調査地点毎の環境DNA濃度とニホンウナギ採捕個体の体重の合計値を示した。環境DNA濃度は、流程に沿った増加または減少傾向は認められず、また採捕したニホンウナギの総体重とも相関関係は認められなかった。ニホンウナギから放出される環境DNAが採捕地点のさらに下流の環境DNA濃度に影響を及ぼすことも考えられる。しかしながら、交差相関分析の結果、いずれの組み合わせにおいても明瞭な相関関係を見出すことはできなかった。

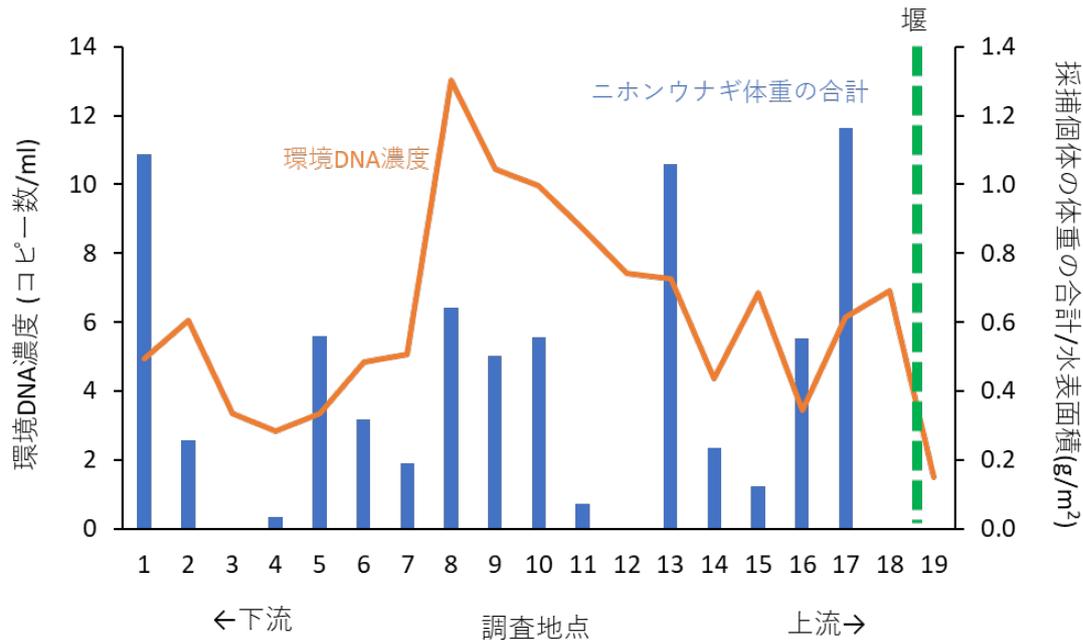


図4 和歌山県高瀬川における50m毎の調査区間での環境DNA濃度、および採捕されたニホンウナギの総体重。調査地点19は今回設定した調査区間のさらに上流地点のデータを示す。

河口からの距離が離れた地点ほどニホンウナギの生息密度が低くなるという調査結果が示されている（本事業2019年度報告書）。また Itakura et al. (2018)はいくつかの河川において、河口からの距離が離れた地点ほど、ニホンウナギの生息密度やバイオマス、環境DNA濃度が低くなる傾向を報告している。今回の調査において、高瀬川でのニホンウナギ採捕数は流程に沿った傾向は認められなかった。高瀬川に設定した調査区間の総流程距離は1kmに満たない比較的小さな空間スケールであり、ニホンウナギの生息密度は流程に沿って変化するというよりも、調査区間内に存在する隠れ場等の配置や量により強い影響を受けることが考えられる。実際、高瀬川の調査区間内では、河岸に造られた石積み護岸が不連続に存在し、多くの個体が石積み護岸を隠れ場所として利用することが分かっている（本事業2019年度報告書）。このようなニホンウナギの不均一な分布が、環境DNA濃度の流程に沿った濃度変化をマスクしている可能性がある。本調査では、それぞれの調査区間で1地点のみ採水調査を行った。川幅の比較的広い区間では、河川の横断面に沿って流速や水深が異なることが普通であり、また河岸の石積み護岸を隠れ場として利用するニホンウナギが多い区間では、河岸近くでより多くの環境DNAが流下している可能性もある。今後は、環境DNA濃度の流程分布に加えて、河川横断面での環境DNAの分布パターンと環境要因、ニホンウナギが利用する空間との関係を調べる必要がある。

### 課題と対応策：

本年度実施した室内実験において、体サイズの大きな個体ほど環境中に放出される環境 DNA 量が多くなることを示した。ただし、濃度の個体差が大きく、環境中に放出される環境 DNA 量は体サイズだけでなく、個体の活動性（代謝）にも強い影響を受けると考えられた。一方、自然河川に生息するニホンウナギのバイオマスと環境 DNA 濃度との関係は、今回の調査では明らかにすることができなかった。今後は、複数河川での調査を実施し、一般性や共通性を検討するとともに、河川横断面での環境 DNA の分布パターンと環境要因、ニホンウナギの空間利用との関係を調べる必要がある。

### 参考文献：

- Itakura et al. (2018) Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale. *Aquatic Conserv.: Mar. Freshw. Ecosyst.* 29: 361-373.
- Minamoto T. et al. (2016) Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17: 23-32.
- Minegishi Y. et al. (2009) Species identification of *Anguilla japonica* by real-time PCR based on a sequence detection system: a practical application to eggs and larvae. *ICES J. Mar. Sci.*, 66: 1915-1919.
- Miya M. et al. (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R Soc Open Sci.* 2(7):150088.