

環境 DNA 等先端技術を活用した外来魚の生息状況把握手法の開発

要旨

2019年6月から7月にかけて、これまでオオクチバスの駆除を続けてきた金原ダム（長野県東御市）において、3回の潜水目視調査を行ったところ、オオクチバスおよび産卵床は全く確認されなかった。2018年7月にオオクチバス1個体が捕獲される以前に、採水、ろ過したサンプルについて、種特異的プライマーを用いて環境DNA分析を行ったところ、微量ながらオオクチバス由来の可能性があるDNAが検出された（現在塩基配列を検証中）。

2018年10月から2019年1月にかけて、那珂川および利根川水系でコクチバスの生息が確認された4カ所の淵において、淵の上流端および下流端で採水を行ったところ、いずれの淵からも上流・下流両端でコクチバスの環境DNA検出があり、その濃度は下流端で顕著に高い傾向がみられた。

2019年5月に、利根川水系思川支流の黒川において、無人航空機（UAV；通称ドローン）を用いてコクチバスの探索を行ったところ、効率的に産卵床を発見でき、産卵床を守る雄個体の有無についても容易に判別可能であることが明らかになった。

1. はじめに

オオクチバスやブルーギル等の有害外来魚の駆除にあたっては各種の捕獲技術が開発され、繁殖抑制技術も進展し、最新の駆除マニュアルで紹介されている（文末の参考資料を参照）。駆除を集中的に行っている水域では外来魚は減少し在来魚が増加する傾向が顕著であるが、残存魚をすべて捕り切ることはむずかしく、個体数のリバウンドが生じることがある。本調査では、過去12年にわたって駆除を行ってきた長野県の金原ダムにおいて、産卵床の見逃しと残存魚が生じる要因を調査し、過去の結果と合わせて、オオクチバスの個体数をリバウンドさせないための手法を提言する。

近年、コクチバスは大河川の中下流域で分布を拡大させており、アユ等漁業権魚種の食害が危惧されている。分布域の1つである那珂川および利根川の本流、支流では、コクチバスの流れ分布が明らかになっている。しかし、冬季、産卵期を控えた親魚が河川のどこに分布しているか、依然として情報が不足している。そこで冬季の目視調査からコクチバスの越冬場所を推定し、新たな手法として、環境DNAを用いたコクチバスの在・不在についての検討を行う。

コクチバスの駆除対策に新たに着手する漁業協同組合では、コクチバスの産卵床を観察した経験が浅いため産卵床を発見できず、繁殖抑制を行うことが難しいことが課題となっている。そこで、無人航空機（UAV；通称ドローン）からの空撮により、産卵床の探索および産卵床を守る雄個体の有無を判別する手法について検討を行う。

2. 長野県東御市の金原ダム湖におけるオオクチバスの根絶～残存個体の有無を環境DNAで探る～

(1) 方法

潜水目視および捕獲調査

長野県上田市の金原ダム湖では、2007年からオオクチバスの駆除調査を行っており、現在、駆除の最終段階にある。今年度は、6月3日、6月15日、および7月5日に調査を行った。

金原ダム湖では、例年6月初旬にオオクチバスの繁殖が始まり、7月に終了する。本年度の調査は、繁殖期における産卵の有無、仔稚魚の出現、成魚の確認に焦点をあてたものである。また、7月中旬以降、金原ダム湖の透明度は低くなり、潜水観察はむずかしくなる。

調査では二名が一組となり、そのうちの一名がドライスーツとシュノーケルを着用し、もう一人は陸上からその補佐を行いつつ、湖岸に沿って一周しながら潜水観察を行った。オオクチバスの成魚に遭遇した場合には水中銃を用いて捕獲を試みるとともに、産卵床や稚魚の有無を確認した。調査は10時から2時間行った。

環境DNA調査

6月1日と7月3日に、潜水目視を行う直前に、ダム湖内の湖水流出部（写真1左側の丸印）と、かつて産卵床が頻繁にみられた地点（写真1右側の丸印）の2カ所において、採水を行った。1Lの採水後、ただちにオスバン1ccを添加し、続いてシリンジ（TERUMO社）とステリベクスフィルター（Merck Millipore社）を用いたろ過処理を行った。一地点あたり2枚のステリベクスフィルターを用い、各500mlずつの環境水をろ過した。ろ過処理後には精製水500mlを用いたろ過も実施し、ネガティブコントロールとした。ろ過処理後のフィルターには安定剤としてRNAlater（Thermo Fisher Scientific社）を充填して冷凍保存し、北海道大学農学部・動物生態学研究室の分子実験室においてDNeasy Blood&Tissueキット（Qiagen社）を用いたDNA抽出を行った。抽出DNAは冷凍保存後、各2μlを用いて定量PCR・Mx3000P（Agilent社）およびオオクチバス特異的プライマーを使ったDNA定量を行い、これをフィルターサンプルあたり6回反復した。

(2) 結果と考察

潜水目視および捕獲調査

今年度の調査においては、オオクチバスによる産卵床は一個も確認されなかった。また、オオクチバスの稚魚や幼魚も確認されなかった。また、これまで毎年観察されていた成魚も、1尾も観察されなかった（図1）。昨年度は成魚を1尾発見し、水中銃で撃ち取った。今年度は、産卵床もそれを守る雄も、別の場所を遊泳する雌も確認されなかったため、完全に繁殖を抑制できたと考えられる。

金原ダム湖では2012年以後、2014年に繁殖を見逃した以外、毎年繁殖を完全に抑制している。このことから、昨年捕獲された標準体長が34cmの個体は、2014年に生まれた4歳魚であると推定される。成魚の捕獲数は2016年に26尾、2017年に8尾、2018年に1尾と年々減少し、今年度は1尾も捕獲されず、観察もされなかった。繁殖も長期間行われていないことから、金原ダム湖のオオクチバスは根絶

されたと推定される。しかし、金原ダム湖は湖周が800m近くあり、最大水深が16mもあるために、残存個体がいる可能性を完全に排除することはできない。そのために、今年度と同様の調査を次年度も行う必要がある。

金原ダム湖のオオクチバスは、2007年に駆除調査を始めたのち、繁殖抑制が十分でなかったことにより、2010年に体長16cm未満の捕獲数が1363となり、ついで2011～2012年に体長16cm以上の成魚の捕獲数が257～308、産卵床数が76～131となるなど、大幅にリバウンドした。しかし、その後、2014年を除いて繁殖抑制を完全に行うことや水中銃を用いた潜水捕獲を行うことによって、個体数を大幅に減少させ、根絶間際まで追い込んでいる。

金原ダム湖では水深が16mもあるため、成魚をすべて捕り尽くすことはむずかしい。特にその透明度は6月までは5m以上あるものの、その後しだいに低下し、夏季以降には1m以下になるため、潜水しても魚を発見しにくくなる。また、繁殖期の雄は浅い場所に留まって産卵床をつくるので、その際に捕獲しやすくなるが、雌は深部を含めて広く動き回るので捕獲しにくい。したがって、完全駆除を達成するためには、大型個体を根気よく捕獲するとともに、繁殖を完全に抑制することが必要である。

昨年度までの調査によって、個体数を大幅に減少させたオオクチバス個体群のリバウンドを防ぐ方法としては、(1)水中銃、電気漁具など大型魚を捕獲するのに適した方法によって、残存成魚をさらに減らすこと、(2)繁殖抑制を数年にわたって完全に行うこと、(3)もし稚魚が生じてしまった場合には、できるだけ小さいうちに大幅に減らすことの3点が不可欠であると結論づけた。今年度にオオクチバスが観察されず、根絶あるいはその直前にまで至っていることは、上記の方針が正しいことを示すものである。

環境 DNA 調査

採水・ろ過を行った2018年6月1日と7月3日ともに、採水後の潜水目視調査で1個体ずつを確認した。オオクチバス特異的プライマーを使ったDNA定量を行った結果、6月1日と7月3日ともに、微量ながらオオクチバス由来の可能性があるDNAが検出された(表1)。しかし、検出されたDNAコピー数は微量であり、かつ、増幅効率がDNA濃度や塩基配列が既知の標準曲線と異なっていた。環境水中に含まれる非特異DNAが増幅された可能性があるため、今後、増幅配列決定による確認を行う必要がある。



写真1 金原ダム全景（写真上がダム湖流入河川；丸印は2018年に行った環境DNAのための採水地点）

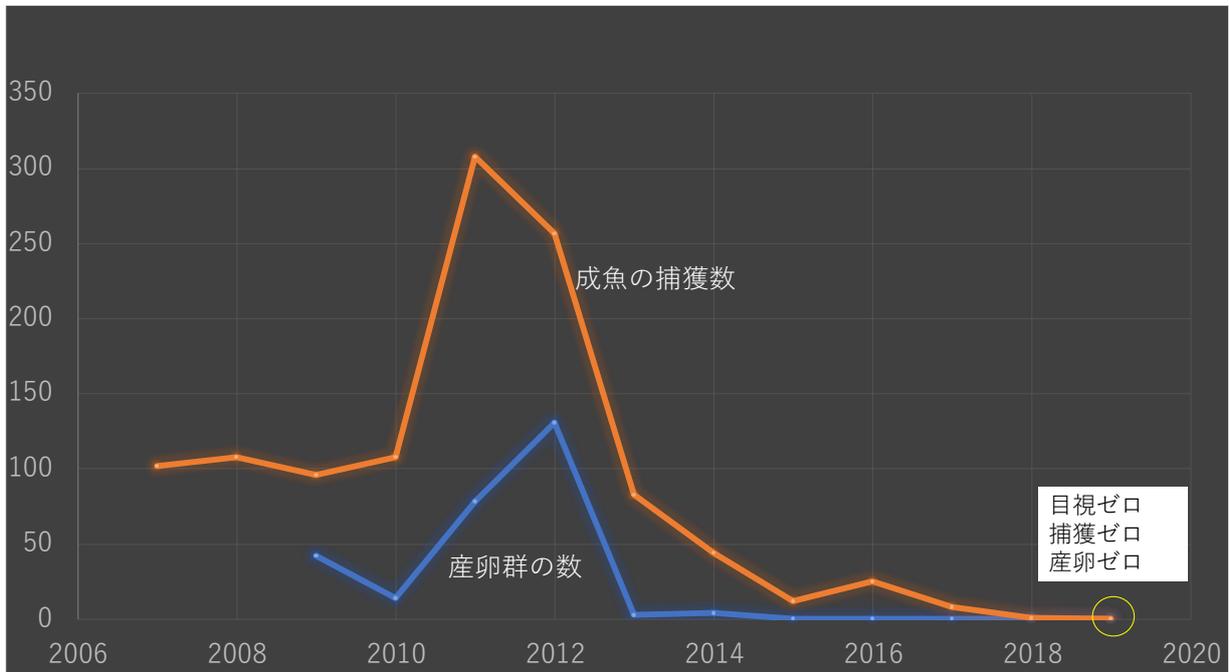


図1 金原ダム湖におけるオオクチバスの推移

表1 金原ダムで行ったオオクチバスの環境 DNA 定量結果.

2018/6/1		オオクチバス環境 DNA 濃度 (環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数)
	検出割合	
金原ダム石碑下	0 /12	
金原ダム流出口	5/12	30.7

2018/7/3		オオクチバス環境 DNA 濃度 (環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数)
	検出割合	
金原ダム石碑下	2/12	22.2
金原ダム流出口	3/12	15.3

3. 那珂川における冬期のコクチバスの分布～目視尾数と環境 DNA との関係性を探る～

(1) 方法

2018年10月から2019年1月にかけて、栃木県を流れる那珂川の本流および鬼怒川支流の黒川において、コクチバスが生息している4カ所の淵の上流端および下流端において採水を行った。調査を行う直前に、環境DNA分析に供するために採水を行った。1Lの採水後、ただちにオスバン1ccを添加し、続いてシリンジ(TERUMO社)とステリベクスフィルター(Merck Millipore社)を用いたろ過処理を行った。一地点あたり2枚のステリベクスフィルターを用い、各500mlずつの環境水をろ過した。各地点でのろ過処理後には精製水500mlを用いたろ過も実施し、地点ごとのネガティブコントロールとした。ろ過処理後のフィルターには安定剤としてRNAlater(Thermo Fisher Scientific社)を充填して冷凍保存し、北海道大学農学部・動物生態学研究室内の分子実験室においてDNeasy Blood&Tissueキット(Qiagen社)を用いたDNA抽出を行った。抽出DNAは冷凍保存後、各2 μ lを用いて定量PCR・Mx3000P(Agilent社)およびコクチバス特異的プライマーを使ったDNA定量を行い、これをフィルターサンプルあたり3回反復した。

(2) 結果と考察

4カ所全ての淵において、潜水目視または刺し網による捕獲によって、コクチバスが確認された(表1)。各地点での環境DNA定量においては、いずれの淵の上・下流からもコクチバス由来のDNAが検出された(図1)。ただしその濃度は淵間・上下流間で異なり、黒川府中橋および那珂川赤岩の淵で下流部においては顕著なコクチバスDNA濃度の上昇がみられた(それぞれ23倍と11倍)。那珂川たけや前の淵でも同様の傾向がみられたが、その倍率は2.5倍程度であった。一方、那珂川水試前の淵では上流側でより濃度の高い結果が得られたが、0.57倍とその濃度差は小さかった。水試前の淵において下流より上流でDNA濃度が高かった理由として、調査時期があげられる。調査を行った10月19日の水温は16.2度であり、瀬にもコクチバスが定位していた可能性がある。一方、下流のDNA濃度が顕著に高かった赤岩の淵の調査時期は1月31日で水温は6.9度であった。このことは、水温が低い時期ほど河川に生息するコクチバスが淵に集中分布することを示唆している。

本研究ではコクチバスの環境DNA濃度は、潜水目視尾数と相関しているとは言えない結果であるものの、淵の上流よりも下流で高い傾向がみとめられた。特に、鬼怒川の支流の黒川では、潜水目視尾数を考慮すると非常に高濃度のコクチバスDNAが検出された。今後、本手法の確立のためには、那珂川水系の支流群においても同様の調査を行うことが有意義であると考えられる。

表1 冬期の那珂川および鬼怒川水系で行ったコクチバスの潜水目視尾数（たけや前の淵のみ刺し網による捕獲尾数）および淵下流におけるコクチバスの環境DNA（環境水1L中の平均推定DNAコピー数）の定量結果

調査年月日	採水地点	潜水目視尾数	コクチバス
		または刺し網による 捕獲尾数	環境DNA濃度
2018/10/19	那珂川 水試前の淵下流	10	532.8
2018/10/29	黒川 府中橋の淵下流	15	20713.3
2018/12/11	那珂川 たけや前の淵下流	18	271.8
2019/1/31	那珂川 赤岩の淵下流	7	1945.7

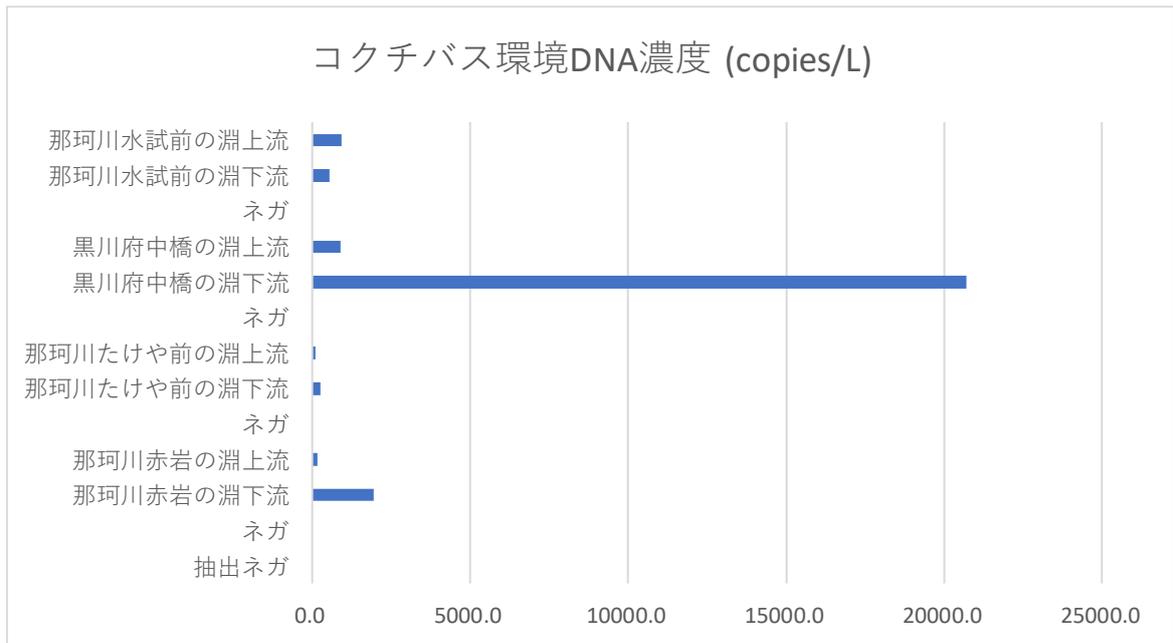


図1 淵の上流および下流でのコクチバス環境 DNA 濃度比較

4. ドローンを用いたコクチバス産卵床の探索

(1) 方法

2019年5月16日に、鬼怒川支流の黒川において、無人航空機（UAV；通称ドローン）を活用して産卵床の探索を行った。

(2) 結果と考察

産卵床の探索を行ったところ、テトラ直下から飛び出してくるコクチバス雄個体が観察され、産卵床を特定することに成功した（写真1，動画URL；<https://vimeo.com/385966358>）。これまで、産卵床の探索は、経験を積まないと発見が難しいとされてきた。実際、産卵床を掘っても、卵が産みつけられていない場合もあり、その見極めが難しい。卵のある産卵床かどうかの判断基準は、産卵床を守る雄個体の有無であるが、警戒心の強いコクチバスは、人間が近づくと逃げてしまうため、雄個体の有無の確認は困難であった。しかし、本研究では、昨年につきドローンを活用して産卵床や雄個体を発見できた。今後、透明度のより低い大河川を含め、他の河川でも、産卵床の探索および雄個体の確認が可能であるか検討を行う必要がある。



写真1 黒川で空撮されたテトラの下のコクチバスの産卵床（矢印は産卵床を守る雄個体）

5. 成果の公表

なし

6. 参考資料

水産庁 (2015)

だれでもできる外来魚駆除 ―オオクチバス、コクチバス、ブルーギルの最新駆除マニュアル―

<http://www.jfa.maff.go.jp/j/enoki/pdf/gairaigyo.pdf>



水産庁 (2018)

だれでもできる外来魚駆除2 ―オオクチバス、コクチバス、チャネルキャットフィッシュの最新駆除マニュアル―

<http://www.jfa.maff.go.jp/j/enoki/attach/pdf/naisuimeninfo-12.pdf>



坪井潤一 (中央水産研究所) 荒木仁志・神戸崇・水本寛基 (北海道大学大学院・農学研究院)