

回遊性魚類の生態を踏まえた河川汽水域の環境改善手法に関する研究

研究予算：運営費交付金

研究期間：平 31～令 3

担当チーム：河川生態チーム

研究担当者：中村圭吾、村岡敬子

【要旨】

本研究では、東北・北陸・北海道の 33 河川を対象に、河川下流域の物理環境と環境 DNA により得られる魚類の分布情報を用いて、回遊性魚類の分布域や生息場に影響を与える物理環境の要素を抽出した。さらに、河川汽水域における人為的インパクトの影響と分布の因果関係がわかりやすいモデル魚種として両側回遊型カジカを選定し、函館の 3 河川において、採捕調査と環境 DNA によって該当種の分布情報を、また、ADCP 等を利用して詳細な物理環境情報を取得した。これらの調査の結果、環境 DNA により検出された魚類相は周辺の水域環境をおおむね反映していることを示す結果が得られ、環境 DNA 調査が河川調査における環境評価に活用可能な調査手法であると示唆された。また、魚類の分布に影響を与える要素として、「砂州の発達」、「河口プールの有無」、「礫質の河床」、「河口の位置」、「埋立地」の要素が、両側回遊型魚類であるカジカ属の回遊に負の影響を与える汽水域の環境要素として「人工地形への開口」が、正の影響を与える要素として「河口砂州」、「自然河岸」が抽出された。さらに、カジカ属の稚魚の遡上適地は、「傾斜が中程度で、底層流速が小さい、岸際や瀬の還流部」であることが示唆された。

1. はじめに

現在、日本に生息する汽水・淡水魚の 6 割近くが絶滅危惧となり、対象種数も年々増加している。このうち回遊性魚類では、ウナギやアユのように漁獲量が減少した種や、回遊性のカジカのように河川単位で絶滅した種も少なくない。河川の生態系を保全するため、淡水域においては、多自然川づくりをはじめとする取り組みが継続的に実施されている。一方、都市化に伴う様々な人間活動により物理環境が変化している河川下流域において、どのような要素が回遊性魚類に影響を与えているのかについては明らかとなっておらず、サケ、ウナギ、アユを含む回遊性魚類が利用する汽水域環境の効果的な改善方法の提案も困難な状況が続いている。本研究では、魚類の利用環境の面から河川汽水域のどのような要素が重要であるかを捉え、利用環境改善のための要素を提案しようとするものである。

調査に当たっては、環境 DNA (environmental DNA ; 以下、eDNA¹⁾) を利用した。eDNA は、水中や土壌といった環境中に存在する組織片などに含まれる DNA で、その遺伝情報を読み取ることで、環境中の生物情報を得ることができる。特に、種網羅解析 (メタバーコーディング解析; 以下 MB 解析) では、eDNA から得られる遺伝情報をデータベースに照合することで、生物群単位などで生物相情報を得ることができる。ここでは DNA データベースへの登録が他の生物群に比

べて進んでいる魚類を対象に MiFish²⁾分析法による MB 解析を使った。本手法については、調査・実験に関する手引きやマニュアル³⁾ が公表されるなど、魚類調査の方法として一般化しつつあるとともに、土木研究所における研究でも、直接採捕と同レベルの taxon (種・属・科など分類学的に優位な集まりであることを示す単位 [複数: taxa]) が得られている⁴⁾。さらに本研究では、MB 解析だけでなく eDNA の分析法として特定の種を対象とした”種特異解析“を利用した。種特異解析では、対象種の在・不在情報を簡便に調べることができるほか、qPCR 装置を使うことでサンプル中に含まれる当該種の DNA の定量が可能である。本研究では、前者を用いて複数の河川を対象に汽水域環境の評価を行うとともに、後者を用いて回遊性カジカの遡上環境の評価を試みた。

2. 研究方法

2.1 eDNA を用いた汽水域環境の評価

2.1.1 汽水域における評価項目の抽出

(1) 調査地および現地調査

2019 年 4 月 23-24 日に、函館湾に注ぐ 12 の中小河川(表-1, 以降河川名は表中に示す記号で示す)の最下流域において、河口付近に各 1 地点を調査地点として選定し、潮汐に伴う反転中の影響を受けていない時間帯に採水ならびに周辺環境の記録を実施した。なお、

表-1 調査対象とした河川の一覧

地 区 (採水年月日)	河川名 (河川 No.)
北海道 函館湾周辺 (2019年4月23,24日)	大釜谷川(H1), 当別川(H2), 茂辺地川(H3), 下町沢川(H4), 宗山川(H5), 戸切地川(H6), 大野川(H7), 久根別川(H8), 石川(H9), 小田島川(H10), 亀田川(H11), 松倉川(H12)
青森県 青森湾周辺 (2019年10月8日)	野内川(A1), 赤川(A2), 堤川(A3), 沖館川(A4), 新城川(A5), 貴船川(A6), 根井川(A7), 天田内川(A8)
新潟県 新潟平野周辺 (2020年11月10日)	福島潟放水路(N1), 阿賀野川(N2), 信濃川(N3), 新発田川(N4), 加治川(N5), 落堀川(N6)
富山県 富山湾周辺 (2020年11月9日)	白岩川(T1), 上市川(T2), 常願寺川(T3), 下条川(T4), 庄川(T5), 新堀川(T6), 神通川(T7)

対象とした河川のうち、H1～5は平野部を通過せず山間部から直接函館湾へと流入していたのに対し、H6～12は函館平野を通過する平坦な流程を呈した。また、H9とH10は、函館港の整備に伴って造成された埋立地に開口している。MB解析に用いる水量は各1Lとし、流心付近の表層水を採水して検体とした。採水後の検体は、塩化ベンザルコニウム溶液を終濃度0.01%となるよう添加した後、冷暗環境を保った状態で実験室へと移送した。

採水地点ならびに河口域周辺に見られる環境特性として、河口砂州の発達(両岸/片岸/無)、河岸の自然度(自然河岸/部分的な人工護岸/人工護岸)、河床材料(砂<2mm)/礫[2-100mm]/コンクリート)、河口プールの形成状況(有/無)を目視確認により記録した。さらに、各河川の周辺地域における土地利用および開発状況に関する資料を参照して流路形状(直線的/曲線的)、流程内に存在するダム(有/無)、河口の開口位置(湾内/湾外)、埋立地の通過(有/無)に関する情報を収集し、解析に用いる付帯情報とした。

(2) eDNAの分析および解析

各河川で採水した検体をメンブレンフィルター(ADVANTEC社、孔径:0.45μm)で全量濾過し、DNeasy Blood Tissue Kit(Quiagen社)を用いて抽出されたDNA溶液を試料としてMB解析を実施し、魚類リストを構築した。

MB解析に基づく魚類リストとの照合を実施するため、各河川の環境情報を変数として、非計量多次元尺度構成法(Non-metric MultiDimensional Scaling;以下、NMDS)による序列化を行なった。

2.1.2 評価項目の詳細検討

調査範囲を青森県(8河川)、新潟県(6河川)、富山県(7河川)に拡大し(表-1)、回遊性カジカにも着目しながら前項と同様の調査を実施した。対象河川を表-1に示す。現地調査・分析および解析は前項と同様に実施した。採水時には、河口域周辺に見られる環境特性として、河口砂州の発達(無/片岸/両岸)、河岸の自然度(自然河岸/部分的な人工護岸/人工護岸)

を目視確認により記録した。さらに、各河川の周辺地域の土地利用および開発状況に関する資料を参照し、河川規模の指標としての河口部の流路幅(m)ならびに、人口集中地区の通過の有無(無/下流側/上流側)、河口部の人工地形化の有無(埋立地・盛土地等、無/片岸/両岸)、最下流域での潮止堰の有無(無/有)に関する情報を収集、解析に用いる付帯情報とした。

2.2 回遊性カジカを指標とした汽水域環境の検討

2.2.1 対象種および調査河川の選定

回遊性魚類の内、河口沿岸域で仔魚期を過ごし、河川汽水域において初期成長を遂げ、巡淡水域へ遡上していく回遊性のカジカは、アユやサケ、あるいは他のハゼ科魚類に比べて移動能力が劣るとされている。このうち地域個体群として環境省版レッドリストに記載されるなど、明らかな減少傾向が示されているカンキョウカジカとハナカジカ(環境省2020)を本研究の対象とし、汽水域における環境要素の抽出を行った。

調査河川として、函館湾にそそぐ河川のうち、2.1.1でカンキョウカジカとハナカジカの生息が確認された3河川を選定した。本河川において遡上時期や範囲などの情報を長年にわたり取得してきた、魚類学者の後藤晃先生に助言を受けながら、調査計画の立案を行った。尚、調査で対象とした海域から汽水域へと遡上した直後のカジカを現地で種判別することは困難であることから、これらを総称してカジカ属魚類として扱った。

2.2.2 調査内容

(1) 現地調査

現地調査は、北海道北斗市を流れる大当別川(流路延長:12.5km)、流溪川(流路延長:7.4km)、大野川(流路延長:28.6km)の汽水域区間において計3回ずつ実施した(Fig.1)。各河川において、事前踏査で確認した感潮状況および落差の位置を元に、大当別川と流溪川では河口から上流420mまで、大野川では上流1,400mまでを調査区間と設定した。調査は、当地におけるカジカ属魚類の遡上盛期かつ汽水域環境の特性

が顕著となる大潮時とし、6月3-5日、6月17-19日、7月3-5日の、最干潮の前後にあたる9:00に開始し塩水遡上に伴う反転流が確認されない時間帯まで行った。

カジカ属魚類の採捕は、Dフレームネット(目合い約1.5mm、底辺長250mm)を用い、河口部から上流方向へと向かって行った。また、大当別川と流溪川では100m間隔、大野川では150mないし200m間隔で分割し、流速(cm/s)、水深(cm)、浮石の有無(1/0)、懸濁有機物の堆積(1/0)、河床材料の有無(1/0;泥、砂、礫、石、コンクリート材)、水際材料の有無(1/0;泥、砂、礫、石、コンクリート材、護岸ブロック材、植生)の物理環境6項目を記録した。またこれらに加え、両側回遊型カジカ類の遡上期における重要環境であると指摘された河口砂州の発達や塩水遡上に伴う堰上げ等によって形成された湛水域(以下、河口プール)に該当しているかを記録した。

(2) eDNAの分析および解析

河口から50mを起点とする5本の横断測線上に左右岸の岸際線から2m離れた地点と流路中央を加えた3点を設定し、各回15サンプルを採水した。採水後のサンプルは現地において速やかに孔径0.45 μ mのメンブレンフィルター(ADVANTEC社、孔径:0.45 μ m)で濾過し、アルミホイルに包んだうえでドライアイスによって凍結し研究室へ持ち帰った。

凍結サンプルからDNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen社)を用いてDNAを抽出し、さらにQIAquick PCR Purification Kit(Qiagen社)を用いて阻害物質を除去して解析試料とした。増幅領域は、ミトコンドリアDNAのCyt-b領域上の79bpとし、カンキョウカジカとエゾハナカジカの両種を増幅可能なプライマーセット(F-primer: 5'-GCAGACGTCGCCATTC-3'、R-primer: 5'-GAGATGCAATT-TGGCCAATG-3')を新たに設計して用いた。eDNAの検出には、SYBR-Green法に基づくqPCR解析を用い、対象としているカジカ2種以外の増幅が無いことを確認した。今回の解析では、StepOnePlus Real-Time PCR System(Thermo Fisher Scientific inc.)を使用し、50サイクルのPCR反応により、解析試料ないし検量線作成用の標準試料を含む20 μ L、試料:2 μ L)中に含まれるeDNA濃度を定量した。qPCR解析は1試料4反復ずつ行い、中央値を代表とした。

(3) ADCPを用いた回遊性カジカの稚魚期の遡上適地評価

北海道函館湾に流入する大野川(流路延長:28.6km)

の河口より約1.2kmの区間を対象に、2021年7月にADCP(Xylem社製SonTek River Surveyor M9)による水深・流速観測を実施し、5m \times 5m区画で河床高、河床の傾斜度、底層流速、表層流速と底層流速の差分の4項目を整備した。これらの環境変数と、2019年6-7月に実施した魚類調査で、遡上中の回遊性カジカ属稚魚(カンキョウカジカまたはエゾハナカジカ)が確認された146地点の分布情報を合わせて、Maxent 3.4.4による分布予測モデルを構築した。分布確率に対する各変数の応答性を算出し、回遊性カジカ属の稚魚期の遡上適地マップを作成した。

3. 研究結果

3.1 eDNAを用いた汽水域環境の評価

3.1.1 汽水域における評価項目の抽出

調査対象とした12河川の全サンプルからはいずれも正常濃度のDNA抽出物ならびに解析用Libraryが得られ、計939,356リードの配列情報が読み取られた。NMDSによる序列化および類型化の結果、環境情報は、2河川(H9,10)からなる小クラスタと10河川(H1-8, H11,12)からなる大クラスタとに分かれたが、検出魚類では、それぞれ4河川からなる2つのクラスタ{(H1-4), (H6-8,11)}と固有性が高くクラスタを形成しない4河川(H5,9,10,12)に分かれた。NMDSに対して有意な適合性を示す変数として、環境情報では砂州の発達、河口プールの有無、礫質の河床材料、河口の位置、埋立地に該当の5項目が抽出された。各河川における魚類の出現傾向として、流路が長く平野部を通過する川では淡水魚類が多く、函館市街地を通過する川では人為由来とみられる海産魚類が、それぞれ多く検出された。さらに、非計量多次元尺度法を用いた序列化の結果、埋立地に開口する河川では回遊魚類の検出数が低下した。

3.1.2 評価項目の詳細検証

MB解析によって、26/33河川で得られたサンプルから64,608 \pm 41,488リード(平均 \pm 標準偏差)の配列情報が読み取られ、淡水:38 taxa、回遊:18 taxa、汽水海水:63 taxa、計119 taxaの魚類が検出された。そのうち、両側回遊型のカジカ類は、ウツセミカジカ(3河川)、カンキョウカジカ(16河川)、エゾハナカジカ(9河川)の3 taxaが含まれた。前項と同様に環境情報の類型化および回遊魚類の検出傾向を照合したところ、人口集中(下流域、上流域)、河口砂州、人工地形に開口、潮止堰、事前河岸、河口砂州が有意な変数として選択された。これらは「河口砂州」と「自

然河岸」が正の方向を、「人工地形への開口」が負の方向の関係を示し、負方向に配置されたクラスタに含まれる河川では、正方向に配置されたクラスタに含まれる河川と比べて両側回遊型カジカの検出頻度が著しく低下することが確かめられた。

3.2 回遊性カジカを指標とした汽水域環境の評価

計3回の現地調査において、393個体のカジカ属魚類の遡上個体が獲られた(1回目:13個体、2回目:141個体、3回目:239個体; 図-3)。調査区間の上流端とした河口1,000mへの遡上個体の到達が確認されたのは2回目調査時以降であった。同時に50個体以上の遡上個体が採捕された高密度地点は、2回目調査時に2地点、3回目調査時に3地点、それぞれL2-L3区間の左岸側のみで確認された。なお、調査区間内においてカンキョウカジカないしエゾハナカジカの成魚は採捕されなかった。

直接採捕による確認数とqPCR解析の結果は互いに矛盾せず、今回検出されたeDNA含有物質の大部分は遡上群を形成する稚魚に由来し、qPCR解析の活用によって初期遡上群の到達地点や遡上盛期の推定が可能と考えられた。また、横断方向に対するeDNA含有物質の拡散は限定的である可能性が高いと判断された。

点群データを用いた遡上適地評価の結果、構築された分布予測モデルのAUCは0.762で、モデル精度の正確さの基準となる0.7を超えた。作成したモデルは傾斜度と底層流速の寄与度が高く、変数の応答から関流域と瀬の環境を表現し、カジカ属稚魚の遡上利用環境をよく示していると考えられた。検討の結果、カジカ属稚魚の遡上適地は、傾斜が中程度で、底層流速が小さい、つまり岸際や瀬の緩流部であることが示唆された。

4. まとめ

本研究の結果、MB解析で検出された魚類相は周辺の水域環境をおおむね反映していることを示す結果が得られ、MB解析技術は河川調査における環境評価に活用可能な調査手法であると示唆されるとともに、達成目標1、2に対して以下の成果を得た。

達成目標1 河川汽水域環境への人為的インパクトが、回遊性魚類の生息場や分布に与えた影響の解明

魚類の分布に影響を与える要素として、「砂州の発達」、「河口プールの有無」、「礫質の河床」、「河口の位置」、「埋立地」の要素が抽出された。また、両側回遊型魚類であるカンキョウカジカとエゾハナカジカを指標とした調査の結果、これら魚類の回遊に負の影響を

与える汽水域の環境要素として「人工地形への開口」が、正の影響を与える要素として「河口砂州」、「自然河岸」が抽出された。これまで回遊性魚類の分布には、河道横断工作物や河川環境の悪化などが要因とされていたが、本研究の結果、下流域における自然性の高さが回遊性魚類の分布に大きく関与していることが明らかとなった。

達成目標2 河川汽水域における回遊性魚類の生息場改善手法の提案

点群データを用いた調査の結果、カジカ属の稚魚の遡上適地は、「傾斜が中程度で、底層流速が小さい、岸際や瀬の還流部」であることが示唆された。こうした場所には、落ち葉や小礫などが安定して存在し、カジカ属の稚魚の隠れ場ともなっていると考えられる。

過年度実施した底生魚や小型の魚類を対象とした魚道の研究⁹⁾では、カジカは面上では流れに対して抗する力が小さいが、内角15度程度のV字空間があることで定位・移動が可能となること確認されている。河口域においても、このような空間を形成することでハビタットの改善を図ることができる可能性も考えられることから、引き続き検討を行っていきたい。

参考文献

- 1) Ruppert, K., M., R. J. Kline and M.S. Rahman: Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA, *Global Ecol. Conserv.* 17, e00547, 2019.
- 2) Bylemans, J., D.M. Gleeson, C.M. Hardy and E. Furlan: Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecol. & Evol.* 8, 8697-8712, 2018.筆者: タイトル、書名、巻号、頁、発行年月
- 3) 宮正樹「環境DNA学会の今(第1回) MiFishプライマーを用いた魚類環境DNA研究の最新動向-1: 海外の研究グループによって明らかにされたMiFishプライマーの高い種検出能力」環境DNA学会ニュースレター, No.2, 17-22, 2020.
- 4) 北川哲郎・村岡敬子・山田拓也・中村圭吾「河川水辺の国勢調査(魚類)における環境DNAメタバーコーディングの試行事例分析」河川技術論文集 26, 319-324, 2020. 環境DNA学会マニュアル Author: Title, Technical Memorandum of PWRI, No.1234, pp.56-78, 2022.1
- 5) 特許第6871599号 魚道及び魚道形成方法 (2021.4)

ABOUT THE FORMAT FOR REPORT OF RESEARCH RESULTS METHODS FOR IMPROVING THE ENVIRONMENT OF RIVERINE BRACKISH WATERS BASED ON THE ECOLOGY OF MIGRATORY FISH

Research Period: FY2019-2021

Research Team: River Restoration Team,
Water Environmental Research Group

Author: NAKAMURA Keigo
MURAOKA Keiko

Abstract: In this study, we used migratory sculpin as a model fish species—as it is easy to understand the causal relationship between its distribution in riverine brackish water and anthropogenic impacts—to clarify what kind of changes in the physical environment in the actual river affected its distribution area and habitat. We conducted surveys in rivers in Tohoku, Hokuriku, and Hokkaido, where distribution information and physical environment of fish species were obtained by environmental DNA, and in three rivers in Hakodate, where the detailed physical environment was obtained by field sampling and an acoustic Doppler current profiler. The results of our analysis indicated that fish fauna detected by environmental DNA generally reflects the surrounding aquatic environment, suggesting that our technique can be used for environmental assessment in riverine surveys. The results also indicated that “sandbar development,” “presence of estuary pools,” “gravelly riverbed,” “location of estuary mouth,” and “reclaimed land” are factors that affect fish distribution. In addition, environmental factors, such as “opening to artificial landforms” and “natural land,” affect the migration of the bilaterally migrating fish species, sculpin, negatively and positively, respectively. The positive influencing factors were identified as “estuarine sandbar” and “natural riverbank.” Furthermore, it was suggested that suitable areas for juvenile sculpins to migrate are near the shore and in the return area of rapids, where the slope is moderate, and the velocity of bottom current is low.

Keywords: environmental DNA, DNA metabarcoding, qPCR, ADCP, sculpin