

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

河川水などから DNA を検出して周辺生息生物を推定する環境 DNA 技術は、近年外来魚などを検出する最先端技術として注目されている。そこで本技術をはじめとする先端技術をオオクチバス、コクチバスの検出に適用した実践的検証結果について報告する。

2007 年から 2020 年までオオクチバスの駆除を継続してきた金原ダム（長野県東御市）において、毎年 6 月から 7 月にかけて、駆除および生息状況を把握するための潜水目視調査を行ったところ、2018 年に雌親魚が水中銃により 1 個体捕獲されたのを最後に、2019 年以降、オオクチバスおよび産卵床は全く確認されなかった。環境 DNA においても、2018 年、2020 年に金原ダム湖で採水を行ったが、オオクチバス由来とされる DNA は検出されなかった。

2018 年 10 月から 2019 年 12 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 8 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。

2018 年および 2019 年の 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、産卵床を見逃さずに除去し、再生産を防ぐことで、完全に駆除できる可能性がある。本調査では、過去 13 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、これまで行ってきたオオクチバスとその産卵床を確認するための潜水目視と併せ、環境 DNA を用いて、完全に駆除できたかどうか検討を行う。

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。そこで冬季の潜水目視調査、および環境 DNA を用いてコクチバスの生息量を定量的に評価することと併せて、コクチバスの越冬場所を推定する。

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。2018 年から 2020 年にかけては、6 月初旬から 7 月上旬まで年 3 回の調査を行った。なお、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。潜水調査は、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、潜水観察は難しくなる。

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（BEUCHAT 社 マンディアルコンペティション 750）で捕獲するとともに、産卵床や稚魚の有無を確認した。調査は午前 10 時から 2 時間行った。

環境 DNA 調査

2018 年 6 月 1 日と 7 月 3 日、2020 年 6 月 8 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 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 (Yamanaka et al. 2016) 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 回または 6 回反復した。

(2) 結果と考察

潜水目視および捕獲調査

2018 年から 2020 年の調査においては、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、2018 年 7 月 3 日に、成魚（成熟メス）1 個体を確認し、水中銃で捕獲した。これ以降の調査では、1 尾も観察されず、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もので、完全に繁殖を抑制できたと考えられる（図 1）。

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、2018 年に捕獲された標準体長が 34 cm 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、2019 年以降は 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、今後も潜水調査を継続する必要がある。

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 16 cm 未満の捕獲数が 1363 個体となり、ついで 2011～2012 年に体長 16 cm 以上の成魚の捕獲数が 257～308 個体、産卵床数が 76～131 箇所となるなど、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、完全駆除に成功したと推察される。

金原ダム湖では水深が 16 m もあるため、成魚をすべて捕り尽くすことはむずかしい。特に透明度は 6 月までは 5 m 以上あるものの、その後しだいに低下し、夏季以降には 1 m 以下になるため、潜水しても魚を発見しにくくなる。また、繁殖期のオス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。

これ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。2019 年、2020 年ともに、オオクチバスが観察されず、完全駆除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。一方、2020 年 6 月 8 日の採水では、前年からオオクチバスは 1 個体も潜水目視で確認されていなかった。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、計 3 回の採水サンプルからは、いずれもごく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。定量 PCR を用いた DNA 定量の場合、ターゲットとする (この場合オオクチバス由来の) DNA がサンプル中に存在しなくても、プライマー部の塩基配列が似通った別の生物由来の DNA を僅かに増幅させてしまう可能性がある。今回も環境水中に含まれる非特異 DNA が増幅された可能性があり、オオクチバス由来の DNA 検出は見られなかったものと結論付けた。この結果は、ダム湖に 1 個体程度の生物密度ではこの手法での DNA 検出は難しいことを示唆すると同時に、2018 年以降、金原ダム湖のオオクチバス密度は一般に高感度と考えられている本技術の検出限界を下回る水準、すなわち控え目に言っても「極めて完全駆除に近い水準」であることを裏付ける結果といえる。



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）

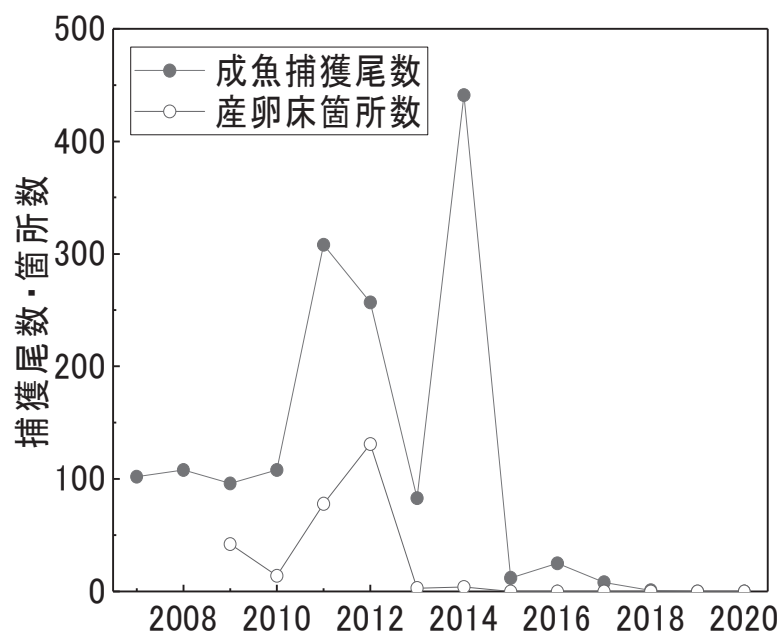


図1 金原ダム湖におけるオオクチバスの推移

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	検出割合	オオクチバス由来の可能性がある環境 DNA 濃度 (環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数)
金原ダム石碑下	0 /12	0
金原ダム流出口	5/12	30.7
2018/7/3	検出割合	オオクチバス由来の可能性がある環境 DNA 濃度 (環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数)
金原ダム石碑下	2/12	22.2
金原ダム流出口	3/12	15.3
2020/6/8	検出割合	オオクチバス由来の可能性がある環境 DNA 濃度 (環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数)
金原ダム石碑下	2/6	21.4
金原ダム流出口	0/6	0

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、および 2019 年 11 月から 12 月にかけて、栃木県を流れる那珂川の本流およびその支流、利根川水系の鬼怒川および黒川において、コクチバスが生息している 8 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 2ul 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（Franklin et al. 2018）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

8 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（図 2）。各地点での環境 DNA 定量においては、淵の上流では非検出の地点を含めて全体に環境 DNA 濃度が低い傾向がみられた。一方、淵下流では各淵の上流と比較すると環境 DNA 濃度が有意に高く（対応のある t 検定, $p = 0.036$ ）、平均値で比較すると淵上流の 17.25 倍の濃度であった。唯一の例外是那珂川上流の淵で、ここ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。那珂川上流の淵で、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那珂川中流の調査時期は、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可能性を示唆している。

本研究ではコクチバスの環境 DNA 濃度は、潜水目視尾数と正の相関がみられ、有意ではないものの川幅が小さいほど濃度が高くなる傾向がみられた（表 2, 図 3）。これらの結果から、コクチバスの生息量を推定する上で、環境 DNA が有力なツールとなることが示唆された。一方、冬季における潜水目視を行うためには、ドライスーツなどの備品をそろえる必要がある上に、低水温での入水となるため抵抗を感じる関係者が多いと推察される。今後環境 DNA の時空間採集頻度を上げるなどの工夫や、環境 DNA 分析技術そのものの発展により、コクチバスをはじめ外来魚の時空間的な分布様式がより正確に明らかになることが期待される。

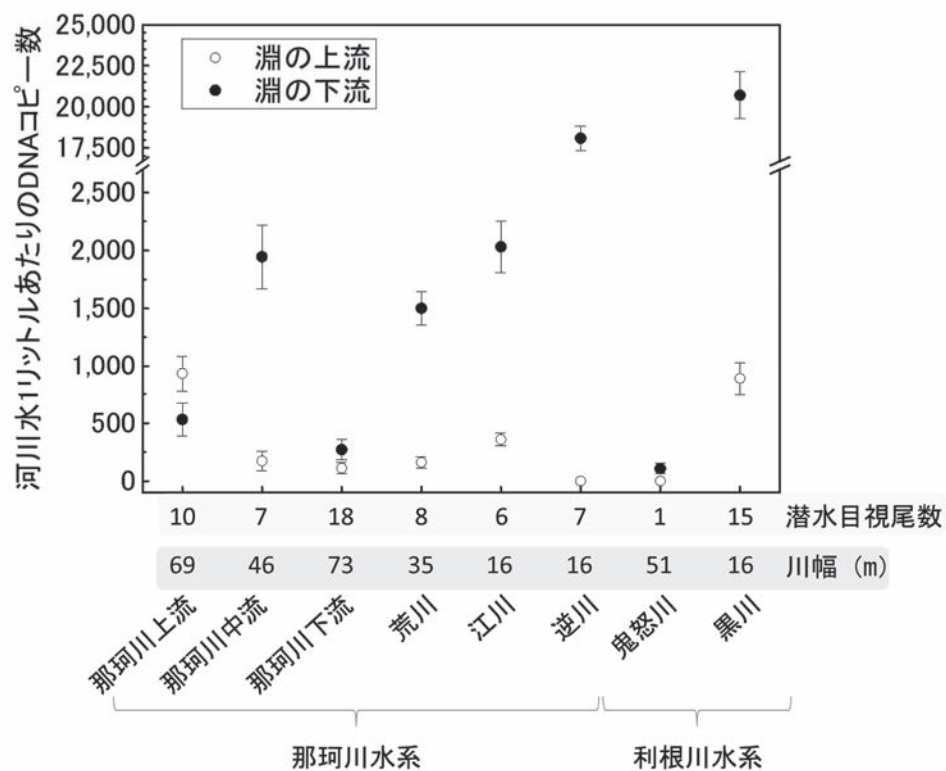


図2 冬期の那珂川および鬼怒川水系で行ったコクチバスの潜水目視尾数（那珂川中流のみ刺網による捕獲尾数）および淵の上・下流におけるコクチバスの環境DNA（環境水1L中の平均推定DNAコピー数）の定量結果。エラーバーは標準誤差を示す。

表 2 冬期の那珂川および利根川水系の淵の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）とコクチバスの潜水目視尾数（那珂川中流のみ刺網による捕獲尾数）、川幅の回帰分析結果

変数	係数	標準誤差	t	p
潜水目視尾数または刺網による漁獲尾数	1196.1	449.8	2.659	0.038
川幅	-170.1	101.0	-1.684	0.143

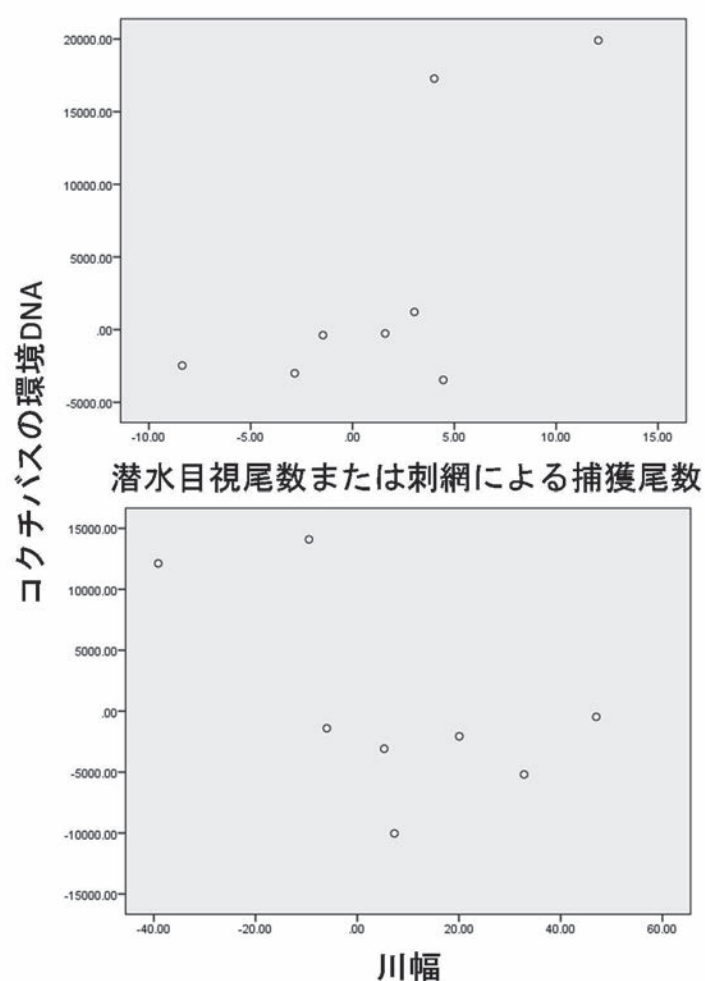


図 3 冬期の那珂川および利根川水系の淵の下流におけるコクチバスの環境 DNA（環境水 1L 中の平均推定 DNA コピー数）とコクチバスの潜水目視尾数（那珂川中流のみ刺網による捕獲尾数）、川幅の回帰分析から得られた偏残差プロット。縦軸、横軸の数値については偏残差であり、実際の観測値を表すものではないことに注意。

4. ドローンを用いたコクチバス産卵床の探索

(1) 方法

2018 年 4、および 2019 年の 5 月に、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。なお、人口集中地区や空港周辺では、飛行が禁止されている。ドローンの基本的なルール、および安全な飛ばし方については、Let's ドローンでカワウ対策 基礎編 (水産庁 2018) を参照されたい。

(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 2, 下記動画参照)。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ってしまうため、雄個体の有無の確認は困難であった。しかし、本研究では、昨年に続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。

ドローンでは逃げないが、人が近づくと逃げるコクチバス <https://vimeo.com/248673159>



河川の中央で産卵床を守るコクチバス <https://vimeo.com/272191346>



テトラの下で産卵床を守るコクチバス (2018 年) <https://vimeo.com/272195828>



テトラの下で産卵床を守るコクチバス (2019 年) <https://vimeo.com/385966358>





写真2 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

Franklin T.W., Dysthe J.C., Rubenson E.S., Carim K.J., Olden J.D., McKelvey K.S., Young M.K., Schwartz M.K. 2018. A non-Invasive sampling method for detecting non-native smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *Northwest Science*, 92(2), 149-157.
<https://doi.org/10.3955/046.092.0207>.

Yamanaka H., Motozawa H., Tsuji S., Miyazawa R.C., Takahara T., Minamoto T. 2016. On-site filtration of water samples for environmental DNA analysis to avoid DNA degradation during transportation. *Ecological Research* 31, 963-967.

<https://doi.org/10.1007/s11284-016-1400-9>.

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>



水産庁（2018）Let's ドローンでカワウ対策 基礎編

<https://www.jfa.maff.go.jp/j/enoki/attach/pdf/naisuimeninfo-10.pdf>



坪井潤一（水産研究・教育機構） 荒木仁志・水本寛基・神戸 崇（北海道大学大学院・農学研究院）