環境DNAによるイトウ・サクラマスの遡上・産卵行動時期の推定

松浦　崇裕[1]・坂口　幸太[2]・大島　正憲[3]・木下　誠一[4,5]

[1]八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：tk-matsuura@yachiyo-eng.co.jp
[2]八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：yt-sakaguchi@yachiyo-eng.co.jp
[3]正会員　八千代エンジニヤリング株式会社（〒111-8648 東京都台東区浅草橋 5-20-8 CS タワー）
E-mail：ms-oshima@yachiyo-eng.co.jp
[4]（前職）北海道開発局 雨竜川ダム調査事業所（〒073-1103 北海道樺戸郡新十津川町字中央 89 番地）
[5]（現職）国土交通省 不動産・建設経済局 建設市場整備課
（〒100-8918 東京都千代田区霞が関 2-1-3）
E-mail：kinoshita-s22ab@mlit.co.jp

石狩川水系の上流に位置する朱鞠内湖及び宇津内湖に生息するイトウ及びサクラマスは生態系の観点から重要な魚類であり，地域の漁協を中心に保全活動が行われている．この2種の保全の観点から個体群の維持及び増加に重要な遡上や産卵時期を把握することは重要である．しかし，当該地域は広大で支川が多いため，捕獲調査による遡上や産卵行動の把握は困難である．そこで，簡易的に2種の遡上・産卵時期を把握するため，環境DNA調査を実施した．その結果，イトウは一般的な産卵期より約１か月半遅く，サクラマスは産卵期のずれは確認されなかった．この結果は既往の魚類調査結果とも概ね一致した．以上のことからこの成果は魚類の遡上や産卵期を推定する手法の１つとして，環境DNAの有効性を示すものである．

Key Words : *environmental DNA，　quantitative PCR，　Parahucho perryi，*
Oncorhynchus masou，　estimation of fish behavior

1. はじめに

(1) 調査地区とイトウとサクラマスの生息状況

北海道石狩川水系の雨竜川上流に位置する朱鞠内湖及び宇津内湖には，環境省レッドリストや北海道レッドデータブックに記載されている重要種かつ国内最大級の淡水魚であるイトウやサクラマスが生息している．特にイトウについては，朱鞠内湖淡水魚漁業協同組合（以下，漁協）を中心に保全活動が行われている．

本論文で調査対象区域とした朱鞠内湖及び宇津内湖は，雨竜第1ダム及び雨竜第2ダム（ともに1943年供用開始）の人造湖である．朱鞠内湖の湛水面積（2,373ha）は，人造湖として日本最大であり，図-1に示すように多数の入り江や湿地環境，流入河川が存在する．また，朱鞠内湖及び宇津内湖を囲む道路は一周約50kmにも及ぶ．

気候は北海道屈指の寒冷・多雪地域であり，1978年2月17日に朱鞠内湖北東部の母子里で戦後の国内最低気温である-41.2℃を記録，積雪深は1982年3月10日に観測史上最深の3.11mが観測されている．同じくイトウが生息していることで知られている猿払村[1)]の近年の積算温度の状況や積雪量を図-2及び図-3に示す．朱鞠内湖周辺と猿払村を比較すると積算温度では春先は約3週間の遅れており，積雪がなくなる時期は約5週間遅れている．

このような厳寒な環境かつ，ダムによって周辺地域の個体群と隔離されている場合，当該地域の環境に適応進化し，一般的な生活史とは異なる可能性が考えられる．特に個体群の維持・増加に直結関与する遡上時期や産卵時期を把握することは希少種保全の観点から重要である．

しかし，通常の捕獲調査や目視による産卵床確認や遡上個体の確認では非常に多くのコストと時間を要する．また，一部河川は禁漁区に指定されており，個体への負荷の大きく、産卵行動を阻害する可能性のある捕獲調査の実施が行えない状態にある．

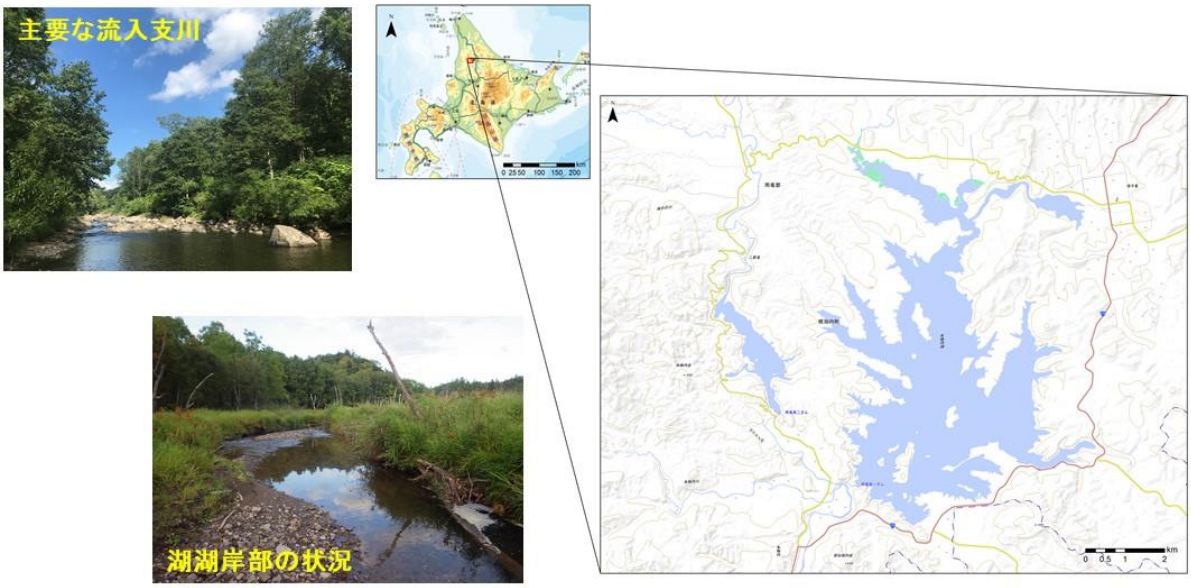

図-1　調査位置と現地の環境

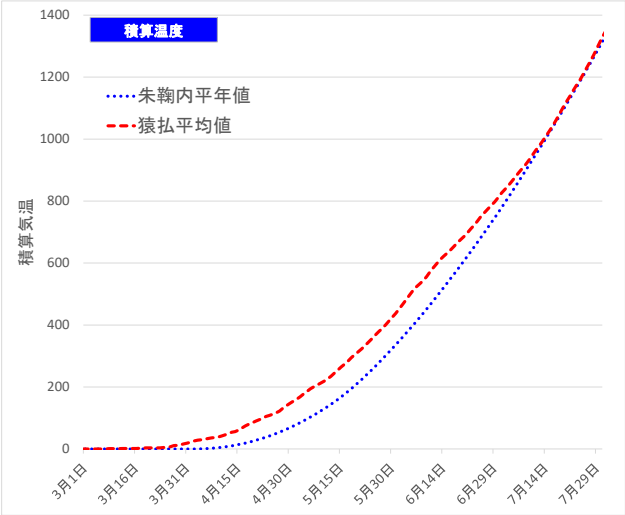

図-2　朱鞠内と猿払村（浜鬼志別）の積算温度

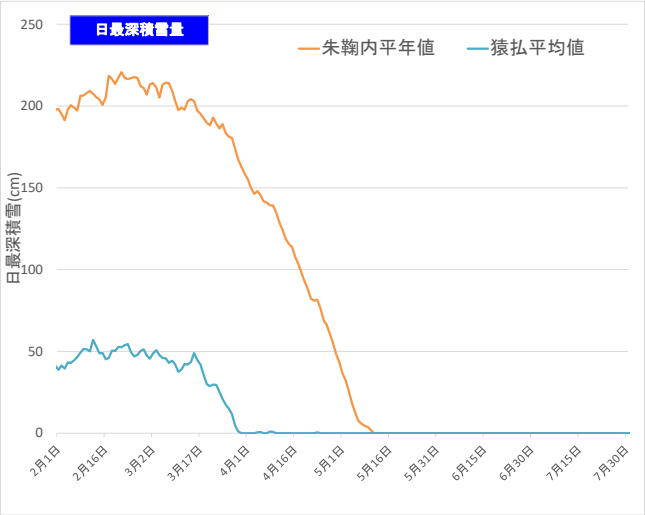

図-3　朱鞠内と猿払村（浜鬼志別）の日最深積雪量

表-1　イトウ及びサクラマスの生態情報と調査時期

		4月			5月			6月			7月			8月			9月			10月		
イトウ	一般的な産卵期	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔												
	漁協からの産卵期情報			↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔												
サクラマス	一般的な淵環境への遡上			↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔												
	一般的な産卵期														↔	↔	↔	↔	↔	↔		
	漁協からの遡上期情報													↔	↔	↔						
	漁協からの産卵期情報																↔	↔	↔	↔	↔	↔
調査時期				●	●	●		●	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●		●

(2) 環境DNA技術と本論文の目的

近年の環境DNA技術は生物相の網羅的な把握（メタバーコディング法）にとどまらず，種特異的なプライマーと定量PCR法を用いることで希少種の生息地の推定[2]，外来種の繁殖地の推定や魚類の流下時期の推定[3, 4]を行った事例が報告されている．

そこで，本論文では簡便に実施可能な環境DNAを用いて，その結果からイトウとサクラマスの遡上時期や産卵期を推定することを目的に調査を実施した．また，分析結果から魚類の遡上時期や産卵期を推定する手法の１つとして環境DNA調査の妥当性について検討した．

2.　調査方法

(1) 調査対象河川

調査地点は朱鞠内湖及び宇津内湖の8つの流入河川で実施した．なお，本論文内において2種の保全の観点か

ら調査位置は明記せず，河川A，河川B…と表記する．

調査時期はイトウの産卵時期である4月下旬～7月上旬に8回，サクラマスの産卵時期である8月中旬～10月下旬まで8回，合計16回調査を実施した．また，通常イトウの産卵時期は4月～5月[5]，サクラマスの産卵時期は9月以降[5]とされているが，当該地域は国内でも屈指の寒冷地域であることと，雨竜第1ダム及び雨竜第2ダムにより他地域の個体群と交雑することがなく，異なる生活史をとりうるという漁協の助言により調査時期を設定した．

(2) 調査の概要

環境DNA分析に供する検体は各対象河川の下流域で約1L採水した．また，当該地域は広大であるため，1回の調査１河川につき採水サンプルは１つとした．また，水中のDNA量と水質の関連を確認するために，採水と同時に水温，濁度，pHを計測した．

(3) 環境DNA分析

採水サンプルは，塩化ベンザルコニウムを約1ml添加し，クーラーボックスに入れ遮光・冷却状態で実験室に運搬した．サンプルのろ過・分析については，基本的に「環境DNA調査・実験アニュアルver2.2」[6]に準拠した．

サンプルをろ過したフィルターからMPure Bacterial DNA Extraction Kit を用いてDNAを抽出した．抽出したDNAはDNeasy PowerClean Pro Cleanup Kitを用いてPCR阻害物質の除去を行った．抽出・精製したDNA溶液はそれぞれ4つのサンプルに分注して以下の作業を実施した．抽出・精製したDNAはquantitative PCR（qPCR）を用い，リアルタイムPCRによって定量PCRをおこなった．定量PCRをおこなう際に用いたイトウとサクラマス特異的なプライマーとTaqMan蛍光プローブについてはイトウに関してはMizumoto et al., (2018) [7]の配列情報をもとに使用し，サクラマスの種特異的なプライマーとプローブについてはDNA Data Bank of Japanのデータを基に作成した．使用したプライマー，TaqMan蛍光プローブについては超純水を使用して同様に定量PCRをおこない，蛍光シグナルが生じないことを確認した．

また，標準試料として，PCRごとにプラスミドによってクローニングされたイトウとサクラマスの人工DNAをイトウについては56, 560, 5600, 560000 copies，サクラマスについては40, 400, 4000, 40000, 400000 copiesについて測定し，それらの結果から検量線を作成することによりサンプルの定量化をおこなった．

3. 調査結果

(1) イトウに関する結果

イトウに関する環境DNA結果を**図-4**に示す．

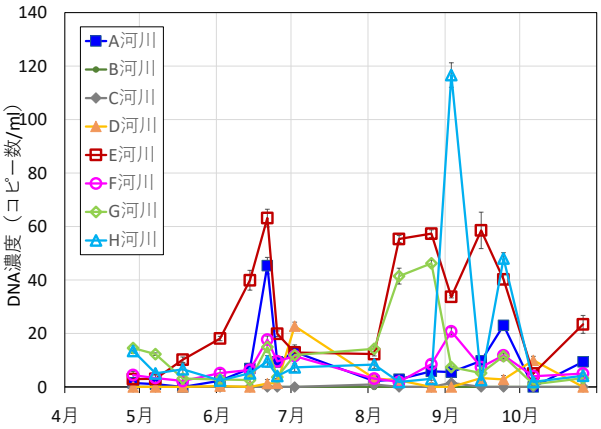

図-4 イトウの環境 DNA 結果
（エラーバーは標準誤差を示す）

一般的には，イトウの遡上・産卵期は4月の融雪期～5月とされているが，当該地域のイトウの産卵期である4月～7月（漁協からヒアリングによる）において，多くの流入河川（8河川中6河川）で6月中旬頃にDNA濃度のピークが確認されたことから，この時期にイトウの遡上・産卵が最も行われていると推定された．

いくつかの河川では8月中旬以降もDNA濃度が高い値を示した．この結果の要因として考えられるのは以下の2つである．１つめはイトウは成熟するまでの1～2年間を河川で過ごす．そのため，産卵河川には稚魚のみならず，孵化後1年～2年の個体が存在するため，夏季水温が上昇し，それらの個体が活動期に入り，その際に放出されたDNAが検出された可能性が考えられる．２つ目は，一部採水地点では湖の水位によっては止水域に類似した環境を有する地点もあり，産卵後，湖に戻った個体が周辺に存在していた可能性が考えられる．

ただし，複数地点（E河川等）で連続して高濃度のDNAが検出されていることから，後者で考えられるように偶発的に採水地点付近に個体がいた可能性は低い．以上のことから8月に一部の河川で確認されたDNA濃度の上昇は，上記で挙げた前者の要因と考えられる．

(2) サクラマスに関する結果

サクラマスに関する環境DNA調査の結果を**図-5**に示す．

多くの流入河川で６月下旬～7月上旬，８月下旬～9月下旬，10 月下旬の３回 DNA 濃度の上昇が確認された．サクラマスの生活史は通常，初夏に一度河川を遡上し，河川の淵等で夏季を過ごす．秋季に入ると河川の最上流へ遡上し，体を河床にぶつけて産卵床を作り，産卵したのちに死亡する[5]．

その生活史を踏まえると，６月下旬～7 月上旬の DNA 濃度の上昇は各河川の上流部に移動し，産卵床の形成と産卵によるものと考えられる．河川間でばらつきはある

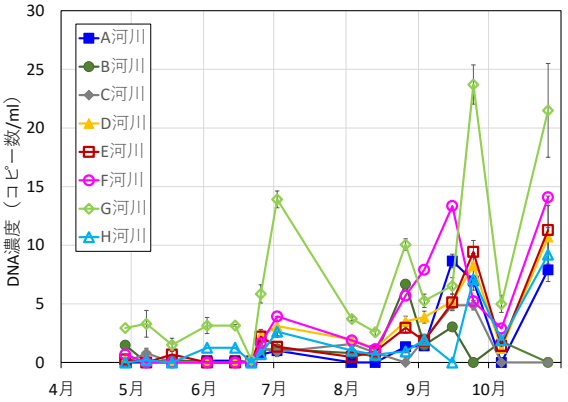

図-5　サクラマスの環境 DNA 結果
（エラーバーは標準誤差を示す）

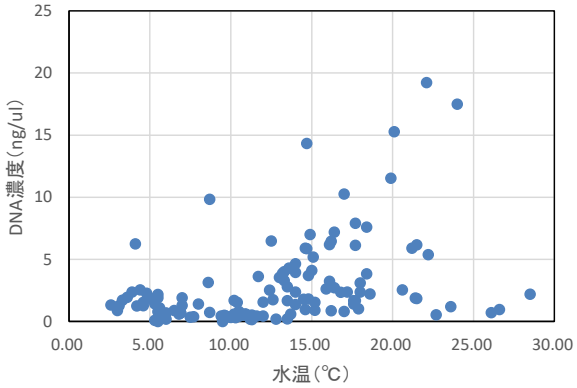

図-6　水温と水中の DNA 量の関係

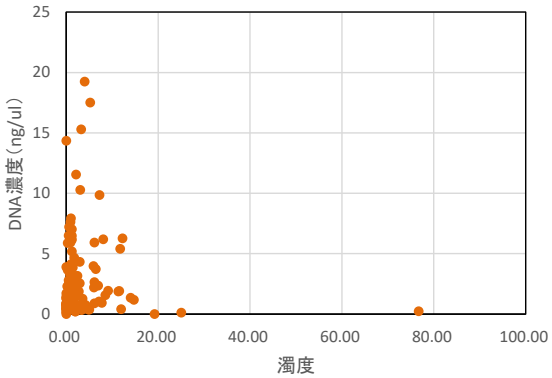

図-7　濁度と水中の DNA 量の関係

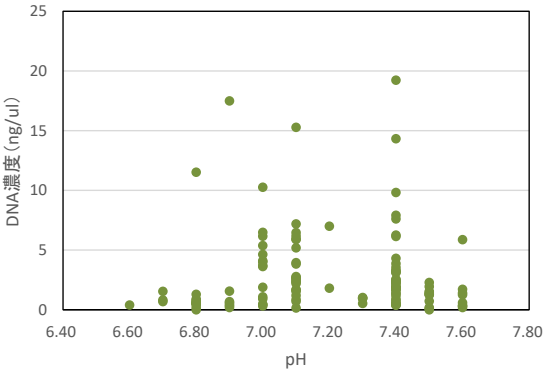

図-8　pH と水中の DNA 量の関係

ものの概ね9月中旬が産卵の最盛期であると考えられる．最後に，10月下旬にほとんどすべての河川でDNA濃度が上昇している．多くの河川でDNA濃度が高い値を示していることから偶発的な要因ではないと考えられる．そのため，この高濃度の値の要因は産卵を終えた個体が死亡し，その死骸から放出されたDNAによるものと考えられる．

(3) 水中のDNA濃度と水質に関する結果

水温とサンプルから抽出・精製されたDNA濃度の関係について図-6に示す．全体的な傾向としては水温が高くなるほどDNA濃度が高い値を示す傾向が確認された．ただし，この傾向は水温が高くなることにより生物の活動が活発化することによるものだと考えられる．また，水温が20℃以上の場合，DNA濃度は低い値を示す傾向が見られた．この要因としては高水温のため，水中の生物の活動が不活発になり，放出されるDNA量が減少した可能性である．特に対象地域に生息する大型の水生生物は今回調査対象としたイトウやサクラマスといったサケ科魚類が中心であり，それらの生物が主要なDNAの放出源であると考えられる．そのため，本研究で確認された20℃以上でDNA濃度が低濃度であった理由としては，高水温による生物の活動が抑制されたためであると考えられる．

濁度とサンプルから抽出・精製されたDNA濃度の関係について図-7に示す．傾向としては濁度が20以上の場合，DNA濃度は極めて低濃度である．しかし，既往研究では水中のDNA濃度と濁度には相関がみられないことが複数事例報告されている[8, 9]．今回濁度20以上のサンプルが2つしかなく，標本サイズを踏まえると高濁度時にDNA濃度が低くなるというのは一般的な傾向ではないと考えられる．

pH とサンプルから抽出・精製された DNA 濃度の関係について図-8示す．pH が 7.0～7.4 程度で DNA 濃度が高い傾向がみられるが，この pH の範囲は最もサンプル数が多い範囲でもあり，サンプル数が多くその中に DNA 濃度が高いものが含まれていた可能性がある．また，今回の調査結果では極端に酸性やアルカリ性に偏った pH も検出されず，すべてのサンプルが pH6.6～pH7.6 の間であったことから，今回の調査結果では pH と DNA 濃度の相関関係は確認されなかった．

4. 考察

(1) 捕獲調査結果との比較検証

本研究では環境DNA調査のみを行ったが，同時期にいくつかの河川では魚類の捕獲調査や過去には漁協によるイトウの産卵床調査[10]も実施している．ここでは，それらの捕獲調査結果と本研究結果を比

較し，イトウ・サクラマスの遡上や産卵行動を把握する手法として，環境DNAの有効性を検討する．

漁協によるイトウの産卵床調査[10]において産卵床が確認されている河川では，環境DNA調査で6月中旬頃にDNA濃度のピークが検出された．このことはイトウが遡上・産卵することでDNA濃度のピークが生じたという推測結果を裏付けるものである．なお，産卵期のイトウは捕獲してしまうと産卵行動をやめる可能性があるため，魚類の捕獲調査は定置網等の産卵期のイトウを捕獲しないような手法で実施しており，推定された産卵ピーク期のイトウの捕獲調査のデータは得られていない．

6月下旬～7月上旬にサクラマスのDNA濃度のピークが確認された河川では，夏季に実施した魚類の捕獲調査時（令和3年7月12～18日実施）にサクラマスが複数地点で捕獲された．このことはサクラマスが夏季に湖から河川の淵環境に遡上しているという推測結果を裏付けるものである．また， 秋季の魚類調査時（令和3年9月13～17日実施）に，河床材がひっくり返されており，サクラマスの産卵床跡が確認され，サクラマスのDNA濃度が産卵行動等により8月下旬～9月下旬で上昇したという推測結果を裏付けるものである．

以上のことから，環境DNA調査結果はイトウ及びサクラマスの遡上動態や産卵行動を反映している可能性が高い．また，この結果はイトウ・サクラマスをはじめとするサケ科魚類の遡上動態を把握する手法の一つとして環境DNA調査の有効性を示すものである．

(2) 環境DNAに関する類似研究との相違

本論文の結果は河野ら[11]やYatuyanagi et al.，(2019)[12]の研究デザインと類似している．一方で，この２つの研究との相違点は表-2に示すとおりである．河野ら[12]やYatuyanagi t al.，(2019)[12]は対象魚種が降下する時期に合わせて調査実施しており，本研究は遡上・産卵時期以外の時期も遡上・産卵していないことを確認するために調査を実施した．その結果として，遡上・産卵期のピークを推定するだけではなく，イトウの幼魚・稚魚の活動の活性化やサクラマスの産卵後の死亡の時期といった遡上や産卵以外の生活史も推定することができた．

表-2　本論文と類似研究との比較

論文	対象種	推定内容
河野ら（2017）	・アユ	・降下時期 ・主要な産卵場
Yatuyanagi et al.,(2019)	・シシャモ	・流下時期
本論文	・イトウ ・サクラマス	・遡上時期及び産卵期 ・幼魚の活動 ・産卵後の死亡

5. まとめ

(1) 本研究の成果

本研究により朱鞠内湖及び宇津内湖の流入河川におけるイトウ・サクラマスの行動について以下のことが明らかになった．

① イトウは今回調査した朱鞠内湖及び宇津内湖に流入する8河川のうち6河川で遡上・産卵を行っており，そのピークは6月中旬頃と推定された．

② サクラマスもイトウ同様に今回調査した8河川のうち8河川で遡上・産卵していると推定された．また，河川の淵環境への遡上は6月下旬～7月上旬，産卵行動のピークは9月中旬であることが推定された．

今回の調査結果は漁協が実施した産卵床調査などと概ね一致する結果であり，サケ科魚類の遡上動態を把握する手法として環境DNA調査の有効性を示すものである．

(2) 課題点

本研究は以下の点において，改善の余地があると考えられる．

① 環境DNA調査と同時に捕獲調査や産卵床調査が行われておらず，実際の産卵規模や遡上個体数と環境DNA濃度の関係が明確にできていない点．

上記の課題を解決するために，今後遡上のピーク期に環境DNA調査と同時に産卵床調査を実施し，環境DNA濃度と産卵床の大きさ，採水地点から産卵床までの距離等を基にDNA濃度と産卵床や個体数の相関関係について把握する必要がある．

謝辞：本研究を実施するにあたってイトウ・サクラマスに関する情報，論文公開へのご理解とご協力をいただいた朱鞠内湖淡水漁協協同組合の皆様に謝意を表す．また，本稿に示した調査・解析については雨竜川ダム調査事業所の発注業務の一部として実施したものを含んでいる．ここに記して御礼申し上げる．

参考文献

1)鷹見達也，川村洋司：北海道におけるサケ科魚類(*Hucho Perryi*)の減少過程．(2008) WildLife Conservation Japan 11（2）：1-5

2)Takahara T., Iwai N., Yasumiba K. and Igawa T.(2019) Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic survey across 3 seasons, *Freshwater Science*, 39, 18-27

3)Iwai N., Yasumiba K. and Takahara T. (2019) Efficacy of environmental DNA to detect and quantify stream tadpoles of *Odorrana splendida*, *Royal Society Open Science*, 6, 181798

4)Maruyama A., Sugatani K., Watanabe K., Yamanaka H. and

Imamura A. (2018) Environmental DNA analysis as a non-invasive quantitative tool for reproductive migration of threatened endemic fish in rivers, *Ecology and Evolution*, 8, 11964-11974
5) 川那部浩哉， 水野信彦， 細谷和海：日本の淡水魚（山溪カラー名鑑）改訂版， 山と渓谷社， 2005
6) 一般社団法人環境DNA学会：環境DNA調査・実験マニュアルVer2.2, 2020
7) Mizumoto H., Urabe H., Kanbe T., Fukushima M. and Araki H. (2018) Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid, *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8 , 569425
8) Kasuda A., Doi H., Souma R., Nagano M., Minamoto T. and Katano I. (2019) Environmental DNA detection and quantification of invasive red-eared sliders, *Trachemy scripta elegans*, in ponds and the influence of water quality, *PerrJ*, e8155
9)糠沢桂， 深川柊， 鈴木祥広 (2020) 高濁度水への環境DNA法の適用に向けたろ過・濃縮手法の基礎的検討, 土木学会論文集G（環境）,Vol.76, No.5, I-19-I26
10)朱鞠内湖淡水漁業協同組合(2020)近年の朱鞠内湖淡水漁業協同組合による様々なイトウ利活用の取組について
11)河野誉仁， 赤松良久， 後藤益滋， 乾隆帝.（2017）環境DNAを用いたアユの定量化と降下状況モニタリングの試み， 河川技術論文集， 第23巻, pp.669-674
12)Yatuyanagi T., Ishida R., Sakata M K., Kanbe T., Mizumoto H., Kobayashi Y., Kamada S., Namba S., Nii H., Minamoto T. and Araki H. (2020) Environmental DNA monitoring for short-term reproductivemigration of endemic anadromous species, Shishamo smelt (*Spirinchus lanceolatus*) . *Environmental DNA* 2, 130-139

(Recieived June 16, 2022)

ESTIMATION OF THE TIMING OF UPSTREAM MIGRATION AND SPAWING BEHABIOR OF PARAHUCHO PERRYI AND ONCORHYNCHUS MASOU BY ENVIRONMENTAL DNA

Takahiro MATSUURA, Yuta SAKAGUCHI, Masnori OSHIMA
And Seichi KINOSHITA

Parahucho Perryi and Oncorhynchus masou inhabiting Shumarinai and Utsunai lakes, located in the upper reaches of the Ishikari River system, are important fish species from an ecosystem perspective, and conservation activities are being conducted mainly by local fishery cooperatives. From the viewpoint of conservation of these two species, it is important to understand the timing of run-up and spawning, which are important for the maintenance and increase of their populations. However, it is difficult to monitor the run and spawning behavior by capture surveys because of the vast area and many tributaries in the area. Therefore, we conducted an environmental DNA survey in order to understand the timing of run-up and spawning of the two species in a simplified manner. The results showed that the spawning season of Parahucho Perryi is about one and a half months later than the general spawning season, and that of Oncorhynchus masou there was no difference in the spawning season. These results were in general agreement with the results of previous fish surveys. These results indicate the effectiveness of environmental DNA as a method for estimating fish runs and spawning seasons.